



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Valentina Ević

KINETIČKA REZOLUCIJA FLUORIRANIH ALKOHOLA KATALIZIRANA LIPAZAMA

Diplomski rad

predložen Kemijskom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog zvanja
magistre kemije

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu, IRB pod mentorstvom dr. sc. Maje Majerić Elenkov. Nastavnik imenovan od strane Kemijskog odsjeka je izv. prof. dr. sc. Ines Primožič.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Enzimaska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)“ (IP-2018-01-4493).

Zahvale

Hvala mojoj mentorici na iznimnom strpljenju, razumijevanju i susretljivosti te Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu na ugodnoj atmosferi i pomoći u radu. Hvala svim profesorima i asistentima koji su mi predavali tijekom osnovne i srednje škole te fakulteta na njihovom trudu, vremenu uloženom u učenike i studente i želji da nam prenesu znanje i interes.

Hvala mojoj sestri i cimerici od početka života na strpljenju, brizi, utjesi i zajedničkom prolasku kroz život. Zahvaljujem i mami, tati i bratu Mati na radostima, podršci i požrtvornosti.

Hvala prijateljici i kolegici Lidiji, docimerici i cimerici, koja mi je kroz fakultetsko obrazovanje bila kao sestra i koja je sa mnom proživljavala moje uspjehe i panike, Kristini na razgovorima i ohrabrenjima, Darku na savjetima, motivaciji i prijateljstvu, Karli na sabranosti, odlučnosti i upornosti, Martini na humoru i vedrini, Mariji C. na motivirajućoj radišnosti, entuzijastičnosti i ljubaznosti, Mariji B. na raspravama i pomoći s usvajanjem gradiva, Vigoru na odanom čuvanju mjesta i kolegijalnosti. Posebno hvala timu M5V na smijehu i timskom radu te kolegama koji su mi pomogli da se snađem na prvoj godini preddiplomskog studija. Hvala i svim ostalim mojim kolegama i prijateljima koji uljepšavaju različita razdoblja mog života.

Sadržaj

| | |
|---|-----|
| SAŽETAK..... | VI |
| ABSTRACT | VII |
| § 1. UVOD..... | 1 |
| § 2. LITERATURNI PREGLED | 2 |
| 2.1. Enzimi u organskoj sintezi | 2 |
| 2.2. Enzimski kinetička rezolucija | 4 |
| 2.3. Lipaze u biokatalizi..... | 6 |
| 2.4. Halogenhidrin dehalogenaze u biokatalizi..... | 10 |
| § 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 13 |
| 3.1. Materijali | 13 |
| 3.2. Metode..... | 13 |
| 3.3. Sintaza supstrata i racemičnih standardnih spojeva | 14 |
| 3.3.1. 1-azido-3-fluorpropan-2-ol (1a) | 14 |
| 3.3.2. 4-fluor-3-hidroksibutanitril (2a)..... | 15 |
| 3.3.3. 1-azido-3-fluorprop-2-il acetat (1b) | 15 |
| 3.3.4. 1-cijano-3-fluorprop-2-il acetat (2b)..... | 15 |
| 3.3.5. 1-fluor-3-klorprop-2-il acetat (3b)..... | 16 |
| 3.4. Biokatalitičke transformacije..... | 16 |
| 3.4.1. Ispitivanje lipaza u kinetičkoj rezoluciji alkohola 1a-3a | 16 |
| 3.4.2. Ispitivanje organskih otapala za kinetičku rezoluciju alkohola 1a-3a | 16 |
| 3.4.3. Biotransformacija alkohola na preparativnoj skali..... | 17 |
| 3.4.3.1. Biotransformacija alkohola 1a katalizirana lipazom iz <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 17 |
| 3.4.3.2. Biotransformacija alkohola 2a katalizirana lipazom iz <i>Pseudomonas cepacia</i> | 18 |
| 3.4.3.3. Biotransformacija alkohola 3a katalizirana lipazom iz <i>Candida antartica</i> | 18 |
| § 4. REZULTATI I RASPRAVA | 19 |
| 4.1. Cilj istraživanja | 19 |
| 4.2. Sintaza supstrata i racemičnih standardnih spojeva | 19 |
| 4.3. Kinetička rezolucija alkohola 1a-3a | 21 |
| § 5. ZAKLJUČAK | 30 |
| § 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA..... | 31 |
| § 7. LITERATURNI IZVORI..... | 33 |

| | |
|----------------------------------|-------------|
| § 8. DODATAK..... | VIII |
| 8.1. GC kromatogrami..... | viii |
| § 9. ŽIVOTOPIS | XII |



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Diplomski rad

SAŽETAK

KINETIČKA REZOLUCIJA FLUORIRANIH ALKOHOLA KATALIZIRANA LIPAZAMA

Valentina Ević

Optički čisti spojevi su vrijedni prekursori u farmaceutskoj industriji. Fluorirani spojevi su aktivne tvari u mnogim lijekovima, stoga su nove mogućnosti sinteze fluoriranih kiralnih građevnih blokova posebno zanimljive i vrijedne. U ovom radu sintetizirana su tri racemična derivata 1-fluorpropan-2-ola koji su supstituirani u položaju 3 azido (**1a**), cijano (**2a**) skupinom i klorom (**3a**) te su korišteni kao supstrati za kinetičku rezoluciju kataliziranu lipazama. Pripremljeni su i odgovarajući racemični acetati alkohola (**1b-3b**) kao standardi. U ovim reakcijama ispitano je pet različitih lipaza. Najaktivnije i najselektivnije lipaze za pojedini alkohol testirane su u različitim organskim otapalima. Lipaze su pokazale nisku do srednje visoku enantioselektivnost prema ispitanim supstratima ($E = 1 - 44$). U preparativnim reakcijama kataliziranim lipazama najviše enantioselektivnosti, pripremljeni su enantiomerno obogaćeni produkti: (*R*)-**1a** ($ev = 65 - 85 \%$), (*S*)-**1b** ($ev = 92 \%$), (*R*)-**2a** ($ev = 84 \%$), (*S*)-**2b** ($ev = 68 \%$) te smjesa (*S*)-**3a** ($ev = 30 \%$) i (*R*)-**3b** ($ev = 69 \%$).

(34+XII stranica, 14 slika, 6 shema, 9 tablica, 37 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Horvátovac 102a, Zagreb i Repozitoriju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Ključne riječi: fluoroalkoholi, halogenhidrin dehalogenaza, kinetička rezolucija, kiralni spojevi, lipaze

Mentor: dr. sc. Maja Majerić Elenkov, v. zn. sur.

Nastavnik (imenovan od strane Kemijskog odsjeka): izv. prof. dr. sc. Ines Primožič

Ocjenitelji:

1. izv. prof. dr. sc. Ines Primožič
 2. doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec
 3. izv. prof. dr. sc. Iva Juranović Cindrić
- Zamjena: doc. dr. sc. Ivana Biljan

Datum diplomskog ispita: 21. veljače 2019.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Diploma Thesis

ABSTRACT

KINETIC RESOLUTION OF FLUOROALCOHOLS CATALYSED BY LIPASES

Valentina Ević

Optically pure compounds are valuable precursors in pharmaceutical industry. Active ingredients in many drugs are fluorinated compounds, therefore the new possibilities in synthesis of fluorinated chiral building blocks are especially interesting and valuable. In this thesis three racemic derivatives of 1-fluoropropan-2-ol were synthesized, substituted at position 3 with azide (**1a**), cyanide (**2a**) and chloride (**3a**) and used as substrates in lipase-catalyzed kinetic resolution. Corresponding racemic acetates were prepared (**1b-3b**) as standards. Five different lipases were tested. Lipase with highest activity and selectivity with each alcohol was tested in different organic solvents. Lipases have shown low to high enantioselectivity toward substrates ($E = 1 - 44$). In preparative-scale reactions catalysed by lipases with highest enantioselectivity, enantiomerically enriched products were prepared: (*R*)-**1a** ($ee = 65 - 85\%$), (*S*)-**1b** ($ee = 92\%$), (*R*)-**2a** ($ee = 84\%$), (*S*)-**2b** ($ee = 68\%$), and mixture of (*S*)-**3a** ($ee = 30\%$) and (*R*)-**3b** ($ee = 69\%$).

(34+XII pages, 14 figures, 6 schemes, 9 tables, 37 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Faculty of Science, University of Zagreb, Horvatovac 102a, Zagreb, Croatia and in Repository of the Faculty of Science, University of Zagreb

Keywords: chiral compounds, fluoroalcohols, halohydrin dehalogenase, kinetic resolution, lipases

Mentor: Dr. Maja Majerić Elenkov, Senior Research Associate

Supervisor (appointed by the Department of Chemistry): Dr. Ines Primožič, Associate Professor

Reviewers:

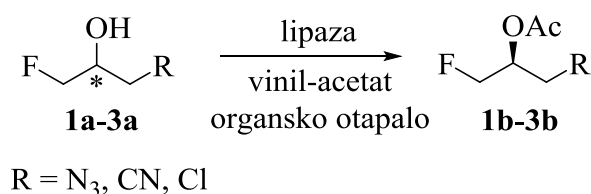
1. Dr. Ines Primožič, Associate Professor
 2. Dr. Jasmina Rokov Plavec, Associate Professor
 3. Dr. Iva Juranović Cindrić, Associate Professor
- Substitute: Dr. Ivana Biljan, Assistant Professor

Date of exam: February 21st, 2019

§ 1. UVOD

Fluorirani spojevi danas imaju značajnu ulogu u razvoju novih lijekova. Uvođenjem fluora moduliraju se fizikalno-kemijska svojstva, kao i farmakološka svojstva molekule. Fluorirani spojevi često posjeduju povećanu metaboličku stabilnost i bioraspoloživost u usporedbi s njihovim nefluoriranim analogima. Fluor ima snažan elektron-odvlačeći induktivni efekt te je i stabilnost susjednih C–H veza značajno povećana. Veza C–F je jako polarna te zbog velike elektronegativnosti fluora ima manju mogućnost stvaranja vodikovih veza u odnosu na kisik i dušik. Fluorirani spojevi u odnosu na analogne ugljikovodike imaju povećanu hidrofobnost, lipofilnost, termalnu i metaboličku stabilnost, kiselost (smanjenu bazičnost) i niže vrelište. Supstitucija fluorom u alifatskim ugljikovodicima ili alkoholima s udaljenom funkcionalnom skupinom dovodi do smanjene lipofilnosti. Brojni lijekovi sadrže jedan ili više atoma fluora, čak trećinu najraširenijih lijekova čine fluorirani spojevi. Takvi lijekovi mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni inhibitori enzima.¹ Zahvaljujući atraktivnim svojstvima organofluoriranih spojeva velik dio sintetske organske kemije usmjeren je upravo na njihovu pripravu. Jedan od pristupa sinteze organofluoriranih spojeva podrazumjeva sintetske modifikacije malih, komercijalno dostupnih spojeva u cilju priprave novih građevnih blokova.

U dosadašnjim istraživanjima u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu proučavane su reakcije enantioselektivnog nukleofilnog otvaranja epifluorhidrina pomoću halogenhidrin dehalogenaza (HHDH).² Ispitane HHDH pokazale su nisku enantioselektivnost u reakcijama te stoga nisu prikladni biokatalizatori za sintezu enantiomerno čistih alkohola **1a-3a**. Cilj ovog diplomskog rada je ispitivanje enantioselektivnosti lipaza u kinetičkoj rezoluciji alkohola **1a-3a** s ciljem njihove priprave u enantiomerno čistom obliku (Shema 1).



Shema 1.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Enzimi u organskoj sintezi

Enzimi su aktivni proteini koji kataliziraju biokemijske reakcije u živim organizmima. Oni sudjeluju u metaboličkim putevima i imaju svoje prirodne supstrate, ali moguća je i njihova šira primjena zato što je utvrđeno da enzimi prihvaćaju i neprirodne supstrate. Za veliku učinkovitost enzima bitan je entropijski efekt. Supstrat ulazi u aktivno mjesto enzima gdje se katalitički aktivne skupine smještaju međusobno blizu, dok su neproduktivna pomicanja ograničena. Entropijski efekt povećava brzinu reakcije te je biokatalizirana reakcija slična brzoj intramolekularnoj reakciji gdje se skupine koje reagiraju u molekuli nalaze u blizini. Tijekom sporijih intermolekulskih reakcija u otopini dolazi do neproduktivnih pomicanja uzrokovanih difuzijom.³

Međunarodna zajednica za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB, engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) bilježi 3700 otkrivenih enzima⁴ što je tek mali udio od 25000 očekivanih u prirodi. Enzimi su podijeljeni u šest kategorija prema tipu reakcija (tablica 1).

Tablica 1. Klasifikacija enzima

| klasa enzima | broj | | tip reakcije |
|--------------------|---------------|----------|---|
| | klasificirani | dostupni | |
| 1. oksidoreduktaze | ~700 | ~100 | oksidacija-redukcija: oksigenacija C–H, C–C, C=C veza, uklanjanje ili dodavanje ekvivalenata vodikovih atoma |
| 2. transferaze | ~750 | ~100 | transfer skupina: aldehidne, ketonske, acilne, fosforilne, metilne, NH ₃ |
| 3. hidrolaze | ~650 | ~180 | hidrolitičko dobivanje estera, amida, laktona, laktama, epoksida, nitrila, anhidrida, glikozida, organohalogenata |
| 4. liaze | ~300 | ~40 | adicija-eliminacija malih molekula sa C=C, C=N, C=O veze |
| 5. izomeraze | ~150 | 6 | izomerizacija kao što je racemizacija, epimerizacija, pregradnja |
| 6. ligaze | ~800 | 5 | nastajanje-cijepanje C–O, C–S, C–N, C–C veze uz cijepanje trifosfata |

Jedna od prednosti enzima je njihova učinkovitost. Reakcije katalizirane enzimima su $10^8 - 10^{10}$ pa i do 10^{17} puta brže od nekataliziranih reakcija te je potrebna mala količina za provođenje reakcija, $10^{-3} - 10^{-4}$ % mola enzima u odnosu na supstrat, dok je kemijskog katalizatora potrebno 0,1 – 1 %.⁵ Također, enzimi su prihvatljivi za okoliš – lako su razgradivi. Još jedna prednost je djelovanje pri blagim uvjetima: pH 5 – 8 i temperatura 20 – 40 °C, čime se smanjuju neželjene reakcije. S obzirom da enzimi funkcioniraju u istim ili sličnim uvjetima, moguće je povezati više enzima u kaskadu reakcija. Time se izbjegava izoliranje međuprodukta te je moguće pomaknuti ravnotežu reakcije prema željenom produktu. Enzimi nisu ograničeni samo na svoje prirodne supstrate, a moguće je raditi i u vodenom i u nevodenom mediju. Danas je poznat veliki spektar reakcija koje je moguće provesti pomoću enzima, pa i one koje nisu izvedive kemijskim metodama.

Za enzime su karakteristični različiti tipovi selektivnosti: kemoselektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost. Enantioselektivnost prema racemičnom supstratu se povezuje s činjenicom da su enzimi građeni od L-aminokiselina te, jer i sami imaju kiralne centre, prepoznaju kiralne supstrate s kojima tvore komplekse enzim–supstrat. Desimetrijacijom mogu prevesti prokiralni supstrat u kiralni produkt.

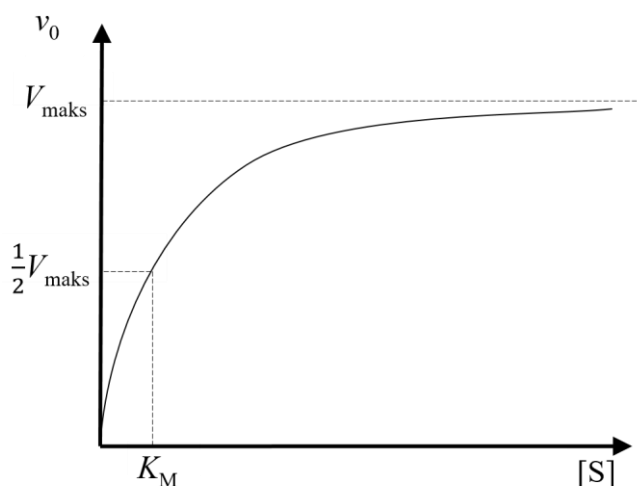
Nedostatak enzima je da postoje samo u jednom enantiomernom obliku i nije poznat način dobivanja zrcalne preslike enzima. Ipak, postoje enzimi koji pokazuju enantioselektivnost prema dugom enantiomeru supstrata. Enzimi funkcioniraju pri blagim uvjetima, a povišenje temperature, pH medija ili koncentracije soli često vodi do deaktivacije proteina. Također, pri niskoj temperaturi enzimi gube aktivnost. Enzimi su najaktivniji u vodi, no većina organskih spojeva je u vodi slabo topljiva. Provođenje reakcije u nevodenom mediju nudi puno prednosti. To su topljivost nepolarnih supstrata u organskom otapalu, niže vrelište i viši tlak para organskih otapala te jeftinije pročišćavanje, sprječavanje sporednih reakcija koje se često događaju u vodi (hidroliza, racemizacija, polimerizacija, raspad), pomicanje termodinamičke ravnoteže hidrolitičkih reakcija, sprječavanje mikrobijalne kontaminacije, provođenje kemijskih reakcija koje nisu moguće u vodenom mediju, mogućnost korištenja enzima izravno u kemijskom procesu.⁶ Nedostatak upotrebe nekih enzima je ovisnost o kofaktorima. Kofaktori, kao što su hem, flavin, NAD(P)H i ATP, su nestabilni, skupi i teško se recikliraju za ponovnu upotrebu. Nadalje, u enzimskim reakcijama može doći do inhibicije supstratom ili produktom. Inhibicija supstratom se može izbjeći postupnim dodavanjem supstrata, dok inhibicija produktom zahtijeva uklanjanje produkta.

Moguće je dodati još jedan uzastopni korak koji bi *in situ* kemijski uklanjao produkt enzima. Enzimi također mogu izazvati alergijske reakcije, no to je moguće izbjeći ispravnim rukovanjem i oprezom.⁷

2.2. Enzimska kinetička rezolucija

Kinetiku enzima opisuje Michaelis-Mentenina jednačba (jednačba 1). Jednačba pretpostavlja ustaljeno stanje u kojem je koncentracija međuprodukta konstantna te vrijedi za sustav u kojem je koncentracija supstrata veća od koncentracije enzima i približno jednaka početnoj koncentraciji supstrata, a koncentracija produkta i povratna reakcija zanemarive. Početna brzina u ovisnosti o koncentraciji supstrata daje hiperbolnu funkciju (slika 1).^{8,9}

$$v_0 = \frac{V_{\text{maks}} + [S]}{K_M + [S]} \quad (1)$$



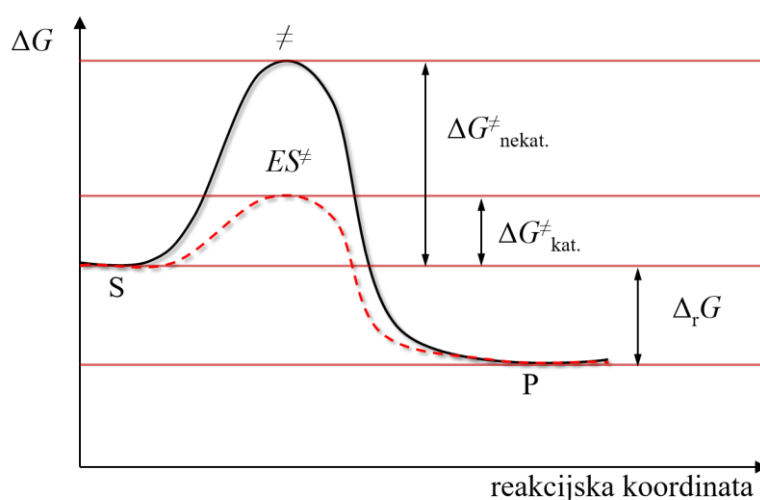
Slika 1. Ovisnost početne brzine o koncentraciji supstrata prema Michaelis-Menteninoj jednačbi (jednačba 1)

Michaelis-Mentenina jednačba ne vrijedi za lipaze zbog njihove specifične aktivacije pri kritičnoj micelarnoj koncentraciji supstrata (više u poglavlju 2.3. Lipaze u biokatalizi).¹⁰

Općenito u kemijskoj reakciji dolazi do nastajanja nestabilnog međuprodukta iz kojeg zatim nastaje produkt. Reakcijska koordinata mora prijeći energijsku barijeru kako bi se sustav doveo u niže energijsko stanje u kojem je produkt. Razlika između energije reaktanta i prijelaznog stanja naziva se aktivacijska Gibbsova energija (ΔG^\ddagger), a razlika između energije

reaktanta i produkta reakcijska Gibbsova energija ($\Delta_r G$). Reakciju je moguće učiniti energetski povoljnijom snižavanjem aktivacijske energije (slika 2). Upravo to čine enzimi povoljnim interakcijama sa supstratom i prevođenjem u jedan ili više međuprodukata. Pri tome se reakcija brže dovodi u ravnotežno stanje, ali se ne mijenja ravnoteža reakcije.¹¹

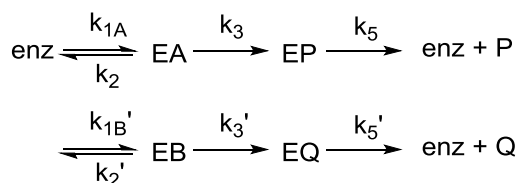
Enzimi koriste interakcije i veze kroz više tipova katalize: kiselinsko-bazna, kovalentna, elektrostatska kataliza i kataliza pomoću metalnog iona. Nekim enzimima je za provođenje reakcija potrebna pomoć kofaktora. Kofaktor može biti metalni ion, organska ili metaloorganska molekula (koenzim) ili prostetička skupina.¹²



Slika 2. Shematski prikaz utjecaja enzima na Gibbsovu energiju reakcije pri čemu je S supstrat, E enzim, \ddagger prijelazno stanje u nekataliziranoj reakciji, ES^\ddagger prijelazno stanje u kataliziranoj reakciji, P produkt reakcije

Kada se racemični supstrat podvrgne enzimskoj reakciji, dolazi do transformacije pretežito jednog enantiomera (shema 2). Zbog kiralnosti aktivnog mjesta, jedan enantiomer bolje odgovara aktivnom mjestu što rezultira većom brzinom reakcije jednog enantiomera, tj. kinetičkom rezolucijom racemata. Za razliku od desimetrizacije koja se u teoriji može provesti s iskorištenjem od 100 %, u kinetičkoj rezoluciji svaki enantiomer se može dobiti s iskorištenjem od 50 %. U praksi vrlo rijetko dolazi do konverzije samo jednog enantiomera i reakcija ne staje na 50 %, nego usporava blizu te vrijednosti. Brzina transformacije svakog enantiomera varira sa stupnjem konverzije s obzirom da se omjer enantiomera mijenja.

Kinetika enzimске rezolucije može se opisati enantiomernim omjerom E (E -vrijednosti). E -vrijednost je konstantna za reakciju i opisuje ovisnost konverzije i enantiomernog viška supstrata ($ev(S)$), odnosno produkta ($ev(P)$) (jednadžbe 2 i 3).⁷



Shema 2.

$$E = \frac{\ln \frac{[ev(P)(1 - ev(S))]}{(ev(P) + ev(S))}}{\ln \frac{[ev(P)(1 + ev(S))]}{(ev(P) + ev(S))}} \quad (2)$$

$$E = \frac{\ln [1 - c(1 + ee(P))]}{\ln [1 - c(1 - ee(P))]} \quad (3)$$

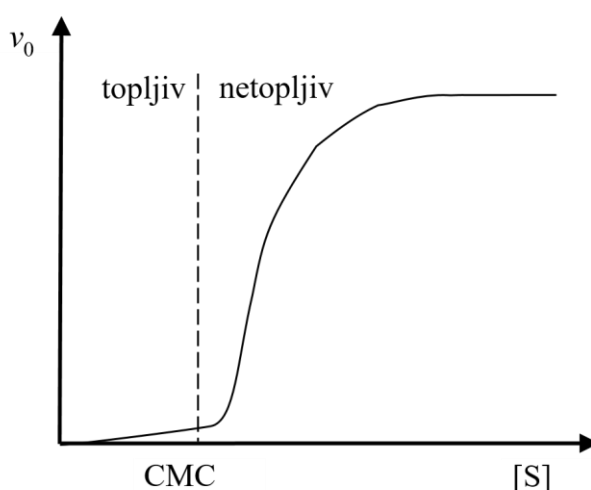
Iznad konverzije od 50 %, povećana koncentracija slabijeg supstrata vodi do povećane transformacije te $ev(P)$ značajno opada nakon konverzije od 50 %. Optička čistoća manje kompatibilnog supstrata je niska do konverzije od 40 %, značajno se poveća oko 50 % te je maksimalna iznad 60 %. Kako bi se dobila optimalna čistoća reakcija se zaustavlja na konverziji od 40 % gdje je čistoća produkta na optimalnoj vrijednosti, a iskorištenje najbliže idealnom od 50 %. Kako bi se dobio što čišći supstrat, produkt se može izolirati, a supstrat podvrgnuti drugom koraku do konverzije od 60 %, gdje je iskorištenje supstrata najbliže konverziji od 50 %.¹³

Enantiomerni omjeri vrijednosti ispod 15 su slabi za praktičnu uporabu. Vrijednosti u rasponu 15 – 30 smatraju se srednjim do dobrim vrijednostima, a iznad 30 odličnima. Vrijednosti $E > 200$ odnose se na visoko enantioselektivne reakcije iz kojih se mogu dobiti produkti enantiomerne čistoće > 99 %.¹⁴

2.3. Lipaze u biokatalizi

Lipaze su enzimi koji hidroliziraju trigliceride do masnih kiselina i glicerola. Često se koriste u organskoj kemiji za pripremu kiralnih produkata te su najbolje istražena skupina enzima.

Veći dio lipaza izoliran je iz bakterija i gljiva, a manji dio iz sisavaca. Iako mogu hidrolizirati i formirati karboksilne estere kao proteaze i esteraze, njihov mehanizam je drugačiji i ima jedinstvena svojstva. Ne prate Michaelis-Menteninu kinetiku ovisnu o koncentraciji supstrata, nego su skoro potpuno neaktivne sve dok je supstrat disociran u otopini (slika 3).¹⁰ Kada se koncentracija supstrata poveća iznad granice topljivosti te se pojavi lipofilni sloj, lipaze postanu aktivne. Ta pojava se naziva interfacijalna aktivacija.¹⁵ Koncentracija supstrata, pri kojoj supstrati nisu više topljivi, a lipaze postaju aktivne, naziva se kritična micelarna koncentracija (CMC). U neaktivnom stanju α -zavojnica prekriva aktivno mjesto^{16–19}, no na granici vodenog i lipofilnog sloja otkriva se aktivno mjesto i enzim prelazi u aktivnu konformaciju. Da bi se stvorio dvofazni medij, može se koristiti povećana koncentracija supstrata ili otapalo koje se ne miješa s vodom.

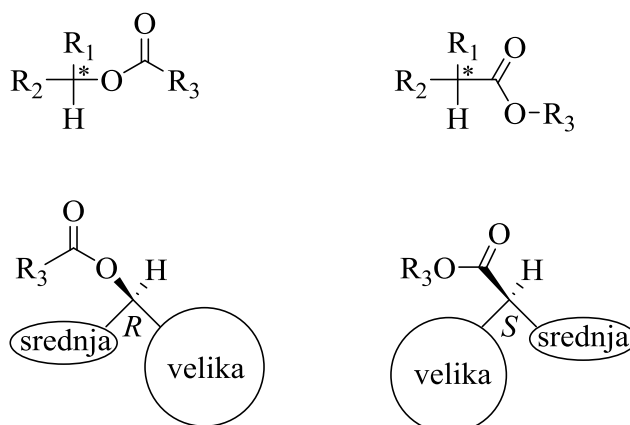


Slika 3. Kinetika lipaza

Lipaze mogu hidrolizirati i estere koji nisu gliceridi te neke mogu hidrolizirati i tioestere.²⁰ S obzirom da su prirodni supstrati esteri triacilgliceridi s kiralnim centrom na alkoholnom dijelu i akiralnom kiselinom, većina supstrata koji se koriste u sintezi su kiralni alkoholi te manjim dijelom kiralne kiseline. Lipaze preferiraju supstrate koji u blizini imaju kiralni centar te vodikov atom na kiralnom ili prokiralnom centru. Ako je kiralni centar na alkoholnom dijelu estera, kiselinski dio bi trebao imati tri do četiri ugljikova atoma zbog lipofilnosti supstrata.

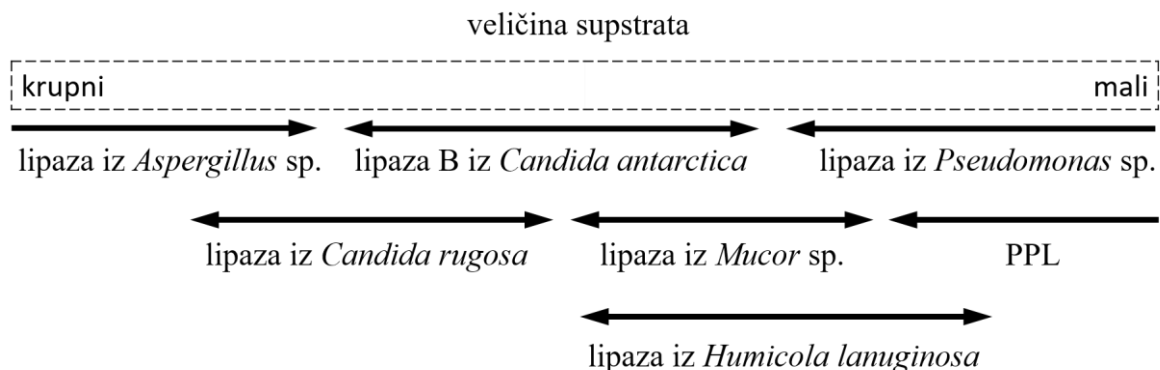
U slučaju estera sekundarnih alkohola većina lipaza pokazuje enantiospecifičnost prema Kazlauskasovom pravilu.²¹ Ako je skupina većeg prioriteta R_1 veća od skupine manjeg

prioriteta R_2 , vjerojatni enantiomer koji će lipaza prihvatiti ima (*R*)-konfiguraciju na alkoholnoj skupini. Točnost predviđanja konfiguracije je $\geq 90\%$, dok je predviđanje α -kiralnog centra na kiselinskoj skupini manje pouzdano. Manji dio supstrata koji imaju kiralni centar na kiselinskoj skupini lipaze lakše prihvaćaju ako alkoholni dio čini dugi nerazgranati lanac kao što je *n*-butanol te će preferirani enantiomer biti (*S*)-konfiguracije (slika 4).



Slika 4. Konfiguracija supstrata lipaza prema Kazlauskasovom pravilu

Lipaze se mogu okarakterizirati prema steričkim zahtjevima za supstrate. Primjerice, lipaza iz *Aspergillus* sp. prihvaća relativno krupne supstrate i pokazuje manju selektivnost prema manjim supstratima, dok su supstrati lipaze iz *Candida* sp. veći i srednje veličine. Lipaze iz *Pseudomonas* sp. i *Mucor* sp. su jako selektivne prema manjim supstratima i teško prihvaćaju veće. Sirova lipaza iz svinjske gušterače (PPL) je smjesa različitih hidrolitičkih enzima te je teško predvidjeti selektivnost, no pročišćena PPL je selektivna prema manjim supstratima (shema 3).⁷



Shema 3.

Često se koriste lipaze iz kvasca *Candida* sp. (*Candida lipolytica*, *Candida antarctica* i *Candida rugosa*). Lipaza iz *C. rugosa*, odnosno *C. cylindracea* (CCL) je često korištena za rezoluciju sekundarnih alkohola, posebno cikličkih, i rjeđe za rezoluciju α -supstituiranih karboksilata. Prema ravnolančanim supstratima pokazuje dobru enantioselektivnost ako imaju velike supstituente, a prema esterima primarnih alkohola pokazuje slabu enantioselektivnost. *Candida rugosa* proizvodi nekoliko izoformi lipaze, a 5 je klonirano i sekvencirano.²²

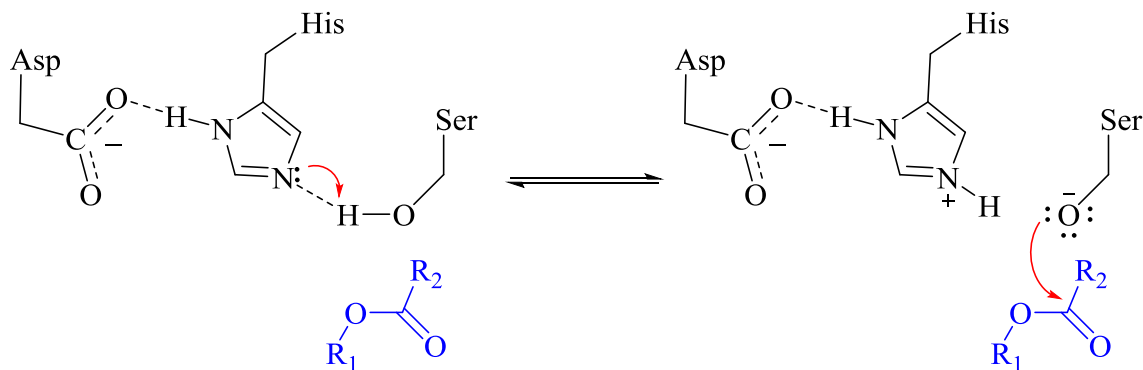
C. antarctica proizvodi dva izoenzima, A (CAL-A) i B (CAL-B). CAL-A je termostabilnija i veže Ca^{2+} , dok je CAL-B manje otporna na ekstremnije temperature i neovisna o prisutnosti metala. CAL-A je jako aktivna prema trigliceridima i ne prihvaća neprirodne estere. CAL-B prihvaća razne neprirodne estere i češće se koristi u sintezi. CAL-B se deaktivira tek pri 50 – 60 °C te nema izraženu interfacijalnu aktivaciju što ju čini sličnijom esterazama. Aktivna je prema supstratima koji imaju kiralni centar ili na alkoholnom ili na kiselinskom dijelu te je moguća i desimetrijacija *meso*-spojeva. Dobri supstrati su manji od supstrata CCL, obično su to acetatni ili butiradni esteri sekundarnih alkohola koji na $\omega 1$ - ili $\omega 2$ -položaju imaju ravni lanac ili monocikličku skupinu.

Visokoselektivne lipaze su izolirane iz *Pseudomonas* sp. (*P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. cepacia*, *P. glumae*) (PSL). Ove lipaze preferiraju „uže“ supstrate i pokazuju selektivnost prema (*R*)-esterima sekundarnih alkohola. Pokazuju i znatnu selektivnost u desimetrijaciji spojeva s udaljenijim prokiralnim centrima te mogu razlikovati i hidrolizirati estere čiji je kiralni centar na atomu sumpora. Tipični supstrati su ($\omega 1$)-acetatni esteri koji s jedne strane imaju malu, a s druge veliku skupinu te prihvaćaju i estere cikličkih sekundarnih alkohola. Posebno su selektivne prema racemičnim i prokiralnim primarnim alkoholima.

Često se koriste i lipaze iz *Mucor* sp. (*M. miehei*, *M. javanicus*) (MSL). Sterički zahtjevi za supstrate su slični supstratima PSL.⁷

Lipaze imaju katalitičku trijadu Ser–His–Asp/Glu i oksianionsku šupljinu u aktivnom mjestu. Aspartat, odnosno glutamat snizuje pK_a histidina i čini ga boljom bazom. His uzima proton serinu i čini ga boljim nukleofilom. Serin djeluje kao kovalentni katalizator te nukleofilno napada supstrat (slika 5). Međuprodukt enzim–supstrat ima tetraedarsku strukturu, stabiliziran je kovalentnom vezom između nukleofilnog kisika bočnog lanca serina te je karbonilni kisik stabiliziran vodikovim vezama u oksianionskoj šupljini. Alkoholna skupina uzima proton s histidina i oslobađa se alkohol, dok je acil još vezan za serin. Histidin

aktivira vodu djelujući kao baza te voda nukleofilno napada acil pri čemu još jednom nastaje tetraedarski međuprodukt. Uzimanjem protona s histidina nastaje karboksilna kiselina.^{23, 24}

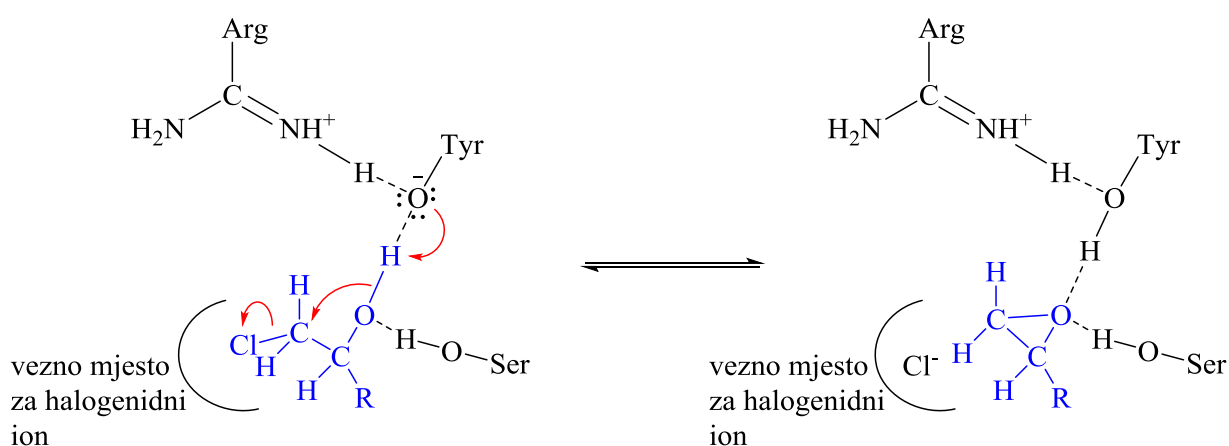


Slika 5. Katalitički mehanizam lipaza

2.4. Halogenhidrin dehalogenaze u biokatalizi

Halogenhidrin dehalogenaze (HHDH) (EC 3.8.1.5.) su bakterijski enzimi koji u prirodi sudjeluju u razgradnji vicinalnih halogeniranih alkohola.⁷

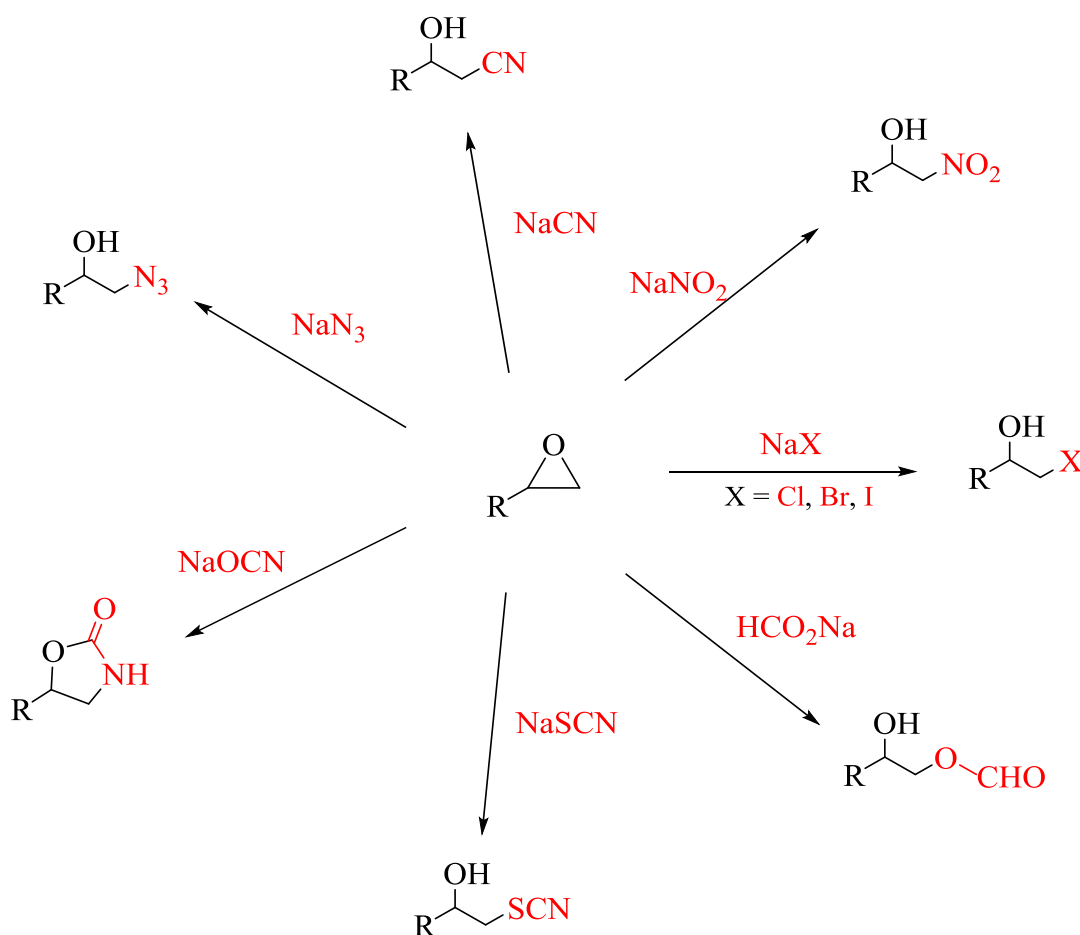
HHDH sadrže katalitičku trijadu Ser–Tyr–Arg. Tyr je baza, dok Ser sudjeluje u vezanju supstrata. Uloga arginina je snižavanje pK_a tirozina koji uzima proton hidroksilne skupine supstrata kako bi se povećala nukleofilnost za otpuštanje halogenidnog iona (slika 6).^{25, 26}



Slika 6. Katalitički mehanizam HHDH

Reakcija koju HDDH katalizira je reverzibilna. U smjeru nastajanja epoksida hidroksilna skupina supstrata se vodikovim vezama veže s hidroksilnim skupinama serina i tirozina. Protonacija tirozina i nukleofilni napad vode do zatvaranja prstena i otpuštanja halogenida. U smjeru otvaranja epoksida dolazi do nukleofilnog napada halogenidnog iona (koji se nalazi u lipofilnom veznom mjestu za halogenidni ion) i simultane aktivacije epoksida protonacijom s tirozinskog bočnog lanca.²⁷

Osim prirodnih nukleofila, halogenidnih iona, otkriveno je da enzim prihvaća niz neprirodnih nukleofila poput azida, nitrita, cijanida, (tio)cijanata i formijata. Brzine reakcija s cijanidom, (tio)cijanatom i formijatom su usporedive s reakcijama s halogenidnim ionima, dok su azidi i nitriti puno bolji nukleofili (slika 7).^{28,29}



Slika 7. Reakcije otvaranja epoksida koje katalizira HDDH

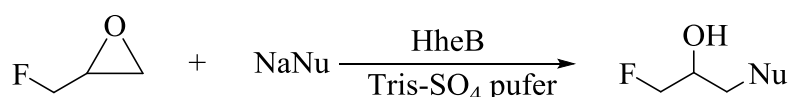
HDDH kataliziraju reakcije uz visoku regioselektivnost, s preferiranim napadom nukleofila na manje supstituirani ugljikov atom epoksidnog prstena (terminalni C-atom).

Također, većina okarakteriziranih HDDH je selektivnija prema supstratima (*R*)-apsolutne konfiguracije.

Otvaranje epoksida kemijskim metodama obično se odvija s manjom regioselektivnosti, potrebna je Lewisova kiselina kao katalizator, visoka temperatura, duže vrijeme trajanja reakcije i korištenje organskih otapala. Biokatalitičko otvaranje epoksida odvija se u vodi, pod blagim uvjetima s visokom regioselektivnosti, stoga HDDH poput enzima HheB iz *Mycobacterium* predstavlja dobar katalizator za pripravu racemičnih alkohola.³⁰

HDDH otvaraju i epihalogenhidrine. Bromoalkoholi i kloroalkoholi su također supstrati HDDH te reakcijska smjesa sadrži različite produkte, dok fluoroalkohol nije supstrat zbog nemogućnosti cijepanja veze C-F. Iz tog razloga je iz epifluorhidrina moguće dobiti 1-supstituirani-3-fluorpropan-2-ol bez nusprodukata. Korištenjem halogenhidrin dehalogenaze iz *Mycobacterium* sp. (HheB) pripremljeni su racemični alkoholi (tablica 2).² U reakciji s azidom postignuta je potpuna konverzija unutar 1 h. Reakcija je napredovala s nešto manjim iskorištenjem i sporije s drugim nukleofilima kao što su Cl^- , NO_2^- i CN^- . Konverzija s nitritom nakon 1 h iznosi 85 %. U reakciji nastaje i nusprodukt nitritni ester. Konverzija u reakciji s cijanidom i kloridom iznosi oko 70 %. Reakcija s cijanidom polagano nastavlja, dok klorid reagira reverzibilno. Za otvaranje epifluorhidrina optimalni uvjeti su uz korištenje 1,5 ekvivalenata NaN_3 , 2 ekvivalenta NaNO_2 i NaCN te 5 ekvivalenata NaCl .

Tablica 2. Rezultati otvaranja epifluorhidrina katalizirano HheB



| Nu | ekvivalenti | t / h | konv. ^a / % | η^b / % |
|---------------|-------------|-------|------------------------|--------------|
| N_3 | 1,5 | 1 | 100 | 92 |
| NO_2 | 2 | 2 | 100 | 31 |
| CN | 2 | 3 | 100 | 84 |
| Cl | 5 | 1 | 100 | 63 |

^a konverzija je određena plinskom kromatografijom

^b iskorištenje nakon izolacije produkta

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

Komercijalno dostupne kemikalije korištene su bez prethodnog pročišćavanja. Epifluorhidrin je nabavljen od tvrtke Manchester Organics, 1-fluor-3-klorpropan-2-ol od tvrtke Combi-Blocks, natrijev cijanid i natrijev azid od Kemike. Od tvrtke Aldrich nabavljeni su vinil-acetat i acetil-klorid. Korištena su otapala: etil-acetat (EtOAc), piridin, toluen, heksan, cikloheksan, *t*-butil-metil-eter (MTBE), diizopropil-eter (DIPE), dietil-eter, diklormetan (DCM) i dimetilsulfoksid (DMSO). Otapala su prije upotrebe pročišćena destilacijom.

Korištene su sljedeće lipaze: *Pseudomonas fluorescens*, PFL (Aldrich, $\geq 20\,000$ U/g; Fluka, 31,5 U/mg), imobilizirana lipaza iz *Candida antarctica*, CAL-B (Sigma), imobilizirana lipaza iz *Mucor miehei*, Lipozyme IM (Novo Nordiks A/S, 49 BIU/g), lipaza iz *Candida cylindracea*, CCL (Fluka, 1,6 U/mg) i lipaza iz *Pseudomonas cepacia*, PCL (Amano). Halogenhidrin dehalogenaza, HheB, prethodno je pripravljena u Laboratoriju za kemijsku biologiju (Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

3.2. Metode

Spektri nuklearne magnetske rezonancije, ^1H -NMR i ^{13}C -NMR, snimljeni su na spektrometru Bruker AV 300. Kao unutarnji standard korišten je tetrametilsilan (TMS), prema kojem su izraženi pomaci u ppm. Konstante sprege (J) izražene su u Hz.

Tankoslojna kromatografija (engl. *thin layer chromatography*, TLC) rađena je na pločicama silikagela DC Kieselgel 60 F₂₅₄ tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka). Za vizualizaciju mrlja korištena je otopina fosfomolibdenske kiseline (55 g fosfomolibdenske kiseline, 7,5 g CeSO₄, 495 mL H₂O i 25 mL koncentrirane H₂SO₄). Kromatografsko pročišćavanje produkata provedeno je na kolonama napunjenim silikagelom tvrtke Sigma Aldrich (veličina pora 60 Å, veličina čestica 63–200 µm).

Plinska kromatografija (GC) provedena je na serijskom plinskom kromatografu Hewlett-Packard 5890 s plameno-ionizacijskim detektorom (300 °C), injektorom za djelomično unošenje uzorka (250 °C) i dušikom kao plinom nosiocem. Tijek reakcija je praćen na koloni HP1 (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent), a enantiomerna čistoća je

određena na kiralnim kolonama Beta DEXTM 225 (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, Supelco) i Lipodex E (25 m × 0,25 mm × 0,16 μm, Machery Nagel) prema uvjetima navedenim u tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti separacije enantiomera racemičnih alkohola **1a-3a** i acetata **2b-3b** na GC kolonama.

| spoj | kolona | metoda | <i>R_t</i> /min | |
|-----------|-----------|--|---------------------------|----------|
| | | | <i>R</i> | <i>S</i> |
| 1a | β-DEX 225 | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 16,50 | 16,83 |
| 2a | Lipodex E | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 16,70 | 16,90 |
| 3a | β-DEX 225 | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 12,22 | 11,97 |
| 1b | β-DEX 225 | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 8,88 | 9,10 |
| 2b | Lipodex E | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 9,97 | 8,74 |
| 3b | β-DEX 225 | 100 °C 0 min, 2 °C min ⁻¹ do 150 °C | 5,73 | 7,14 |

3.3. Sinteza supstrata i racemičnih standardnih spojeva

3.3.1. 1-azido-3-fluorpropan-2-ol (**1a**)

U okruglu tikvicu od 100 mL odvagan je epifluorhidrin (0,5 g, 6,573 mmol), dodan Tris-SO₄ pufer (60 mL, 0,5 M, pH 7,5), NaN₃ (0,641 g, 9,859 mmol) i enzim HheB (2,5 mL sirovog enzimskog ekstrakta). Sintaza je provedena u zatvorenoj tikvici 3 h pri sobnoj temperaturi uz miješanje pomoću magnetske miješalice. Reakcijska smjesa ekstrahirana je s EtOAc. Organski ekstrakt osušen je na bezvodnom Na₂SO₄. Dobiveno je 571,6 mg produkta **1a** (η = 73 %). Izolirani produkt analiziran je NMR spektroskopijom i plinskom kromatografijom.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2,39 (1H, d, J = 6,0 Hz), 3,4-3,46 (2H, m), 3,97-4,10 (1H, m), 4,49 (2H, ddd, J_1 = 47,0 Hz, J_2 = 7,0 Hz, J_3 = 5,0 Hz) ppm

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 52,5 (d, J = 6,5 Hz), 69,4 (d, J = 25,0), 85,9 (d, J = 170,0 Hz) ppm

3.3.2. 4-fluor-3-hidroksibutanitril (**2a**)

U okruglu tikvicu od 100 mL odvagan je epifluorhidrin (0,5 g, 6,573 mmol), dodan Tris-SO₄ pufer (65 mL, 0,5 M, pH 7,5), DMSO (0,5 mL) i NaCN (1,611 g, 13,146 mmol). Sinteza je provedena u zatvorenoj tikvici 2,5 h pri sobnoj temperaturi uz miješanje pomoću magnetske miješalice. Reakcijska smjesa ekstrahirana je s EtOAc. Organski ekstrakt osušen je na bezvodnom Na₂SO₄. Produkt je pročišćen na koloni silikagela uz mobilne faze različite polarosti (heksan:DCM (1:1), zatim čisti DCM te DCM:EtOAc (9:1)). Dobiveno je 272,2 mg produkta **2a** (η = 40 %). Pročišćeni produkt analiziran je NMR spektroskopijom i plinskom kromatografijom.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2,61–2,70 (2H, m), 2,93 (1H, d, J = 5,76 Hz), 4,20 – 4,24 (1H, m), 4,48 (2H, dd, J_1 = 48,0 Hz, J_2 = 6,0 Hz) ppm

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 21,8 (d, J = 7,5 Hz), 66,3 (d, J = 28,5 Hz), 84,5 (d, J = 173,5 Hz), 116,7 ppm

3.3.3. 1-azido-3-fluorprop-2-il acetat (**1b**)

U okruglu tikvicu od 5 mL odvagan je alkohol **1a** (0,081 g, 0,680 mmol), dodan piridin (1 mL) i acetil-klorid (0,243 mL, 0,267 g, 3,40 mmol). Reakcija je provedena u tikvici s klor-kalcijevog cjevčicom 1,5 h pri sobnoj temperaturi uz miješanje pomoću magnetske miješalice. Reakcijska smjesa je uparena dodavanjem toluena. Sirovi produkt pročišćen je na koloni silikagela uz heksan:EtOAc (9:1) kao mobilnu fazu. Dobiveno je 42,7 mg produkta **1b** (η = 39 %). Pročišćeni produkt je analiziran NMR spektroskopijom i plinskom kromatografijom.

¹H NMR (CDCl₃): δ = 2,14 (3H, s), 3,53 (2H, d, J = 5,13 Hz), 4,54 (2H, dd, J_1 = 4,2 Hz, J_2 = 46,9 Hz); 4,45 – 5,17 (1H, m) ppm

¹³C NMR (CDCl₃): δ = 20,8, 49,7 (d, J = 6,0 Hz), 70,6 (d, J = 20,5 Hz), 81,2 (d, J = 173,5 Hz), 170,0 ppm

3.3.4. 1-cijano-3-fluorprop-2-il acetat (**2b**)

U okruglu tikvicu od 5 mL odvagan je alkohol **2a** (0,050 g, 0,485 mmol), dodan piridin (0,7 mL) i acetil-klorid (0,180 mL, 0,191 g, 2,43 mmol). Reakcija je provedena u tikvici s klor-kalcijevog cjevčicom 1 h pri sobnoj temperaturi uz miješanje pomoću magnetske miješalice. Reakcijska smjesa je uparena dodavanjem toluena. Sirovi produkt pročišćen je na koloni

silikagela uz heksan:EtOAc (7:3) kao mobilnu fazu. Dobiveno je 59,4 mg produkta **1b** ($\eta = 84$ %). Pročišćeni produkt je analiziran NMR spektroskopijom i plinskom kromatografijom.

^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2,16$ (3H, s), $2,83$ (2H, d, $J = 4,0$ Hz), $4,70$ (2H, dd, $J_1 = 47,0$ Hz, $J_2 = 4,0$ Hz, $J_3 = 1,8$ Hz), $5,17$ - $5,27$ (1H, m) ppm

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 19,0$ (d, $J = 7,0$ Hz), $20,7$, $67,0$ (d, $J = 24,0$ Hz), $81,5$ (d, $J = 181,0$ Hz), $115,5$, $169,7$ ppm

3.3.5. 1-fluor-3-klorprop-2-il acetat (**3b**)

U okruglu tikvicu od 5 mL odvagan je 1-fluor-3-klorpropan-2-ol (**3a**) (0,100 g, 0,889 mmol), dodan piridin (1,3 mL) i acetil-klorid (0,320 mL, 0,349 g, 4,443 mmol). Sinteza je provedena u tikvici s klor-kalcijevog cjevčicom 1 h pri sobnoj temperaturi uz miješanje pomoću magnetske miješalice. Reakcijska smjesa je uparena dodavanjem toluena. Sirovi produkt pročišćen je na koloni silikagela uz heksan:EtOAc (7:3) kao mobilnu fazu. Dobiveno je 72,1 mg produkta **3b** ($\eta = 52$ %). Pročišćeni produkt je analiziran NMR spektroskopijom i plinskom kromatografijom.

^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2,13$ (3H, m), $3,62 - 3,75$ (2H, m), $4,47 - 4,74$ (2H, m), $5,12 - 5,23$ (1H, m) ppm

^{13}C NMR (CDCl_3): $\delta = 20,8$, $40,8$ (d, $J = 7,5$ Hz), $71,2$ (d, $J = 22,5$ Hz), $80,9$ (d, $J = 173,5$ Hz), $169,9$ ppm

3.4. Biokatalitičke transformacije

3.4.1. Ispitivanje lipaza u kinetičkoj rezoluciji alkohola **1a-3a**

U Erlenmeyerovu tikvicu odvagan je supstrat **1a-3a** (10 mg, 0,084 – 0,097 mmol), otopljen u heksanu (5 mL) te je dodan vinil-acetat (1 mL, 14,0 mmol). Reakcije su provedene u termostatiranoj tresilici na 30°C i 220 rpm. Pokrenute su dodatkom 10 mg enzima (CAL-B, Lipzyme IM, CCL, PCL i PFL) te su praćene plinskom kromatografijom. Uzorci su analizirani u vremenskim intervalima 30–60 min.

3.4.2. Ispitivanje organskih otapala za kinetičku rezoluciju alkohola **1a-3a**

U tikvicu je odvagan supstrat **1a-3a** (10 mg, 0,084 – 0,097 mmol), otopljen u različitim otapalima (5 mL) te je dodan vinil-acetat (1 mL, 14,0 mmol). Korištena su otapala: heksan,

cikloheksan, toluen, MTBE i DIPE. Reakcije su provedene u termostatiranoj tresilici na 30 °C i 220 rpm. Pokrenute su dodatkom 10 mg enzima PFL za **1a**, PCL za **2a** i CAL-B za **3a**. Reakcije su praćene plinskom kromatografijom. Uzorci su analizirani u vremenskim intervalima 30–60 min.

3.4.3. Biotransformacija alkohola na preparativnoj skali

3.4.3.1. Biotransformacija alkohola **1a** katalizirana lipazom iz *Pseudomonas fluorescens*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL dodan je alkohol **1a** (200 mg, 1,679 mmol), heksan (50 mL), vinil-acetat (10 mL, 140 mmol) i enzim PFL (100 mg). Reakcija je provedena u termostatiranoj tresilici na 30 °C i 220 rpm i prekinuta nakon 3h kod konverzije od 50%. Smjesa je profiltrirana, uparena i pročišćena kromatografijom na koloni silikagela uz heksan:EtOAc (9:1) kao mobilnu fazu. Dobiveno je 72,5 mg acetata (*S*)-**1b** ($\eta = 27\%$) i 11,8 mg alkohola (*R*)-**1a** ($\eta = 6\%$).

Sinteza je ponovljena i uz lipazu PFL niže katalitičke aktivnosti. U tikvicu je dodan alkohol **1a** (570 mg, 4,80 mmol), heksan (200 mL), vinil-acetat (50 mL, 700 mmol) i PFL (107 mg). Reakcija je provedena u istim uvjetima i prekinuta nakon 7 h kod konverzije od 39 %. Nakon izolacije i pročišćavanja dobiveno je 86,0 mg acetata (*S*)-**1b** ($\eta = 11\%$) i 65,4 mg alkohola (*R*)-**1a** ($\eta = 11\%$).

Snimljeni su NMR spektri koji odgovaraju spektrima racemata.

PFL (Aldrich, $\geq 20\,000$ U/g)

$ev(\mathbf{1a}) = 85\%$

$ev(\mathbf{1b}) = 86\%$

$[\alpha]_D^{st}(\mathbf{1b}) = +29,5$ (c 1,22 CHCl₃)

$E = 36$

uz PFL (Fluka, 31,5 U/mg)

$ev(\mathbf{1a}) = 60\%$

$ev(\mathbf{1b}) = 92\%$

$[\alpha]_D^{st}(\mathbf{1a}) = +4,3$ (c 0,92 CHCl₃)

$[\alpha]_D^{st}(\mathbf{1b}) = +33,7$ (c 0,89 CHCl₃)

$E = 44$

3.4.3.2. Biotransformacija alkohola **2a** katalizirana lipazom iz *Pseudomonas cepacia*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL dodan je alkohol **2a** (200 mg, 1,940 mmol), heksan (50 mL), vinil-acetat (10 mL, 140 mmol) i enzim PCL (100 mg). Reakcija je provedena u termostatiranoj tresilici na 30 °C i 220 rpm. Tijek reakcije praćen je GC-om. Reakcija je zaustavljena nakon 6h kod konverzije od 55 %. Smjesa je profiltrirana, uparena i pročišćena kromatografijom na koloni silikagela uz heksan:EtOAc (7:3) kao mobilnu fazu. Dobiveno je 146,6 mg acetata (*S*)-**2b** ($\eta = 53\%$) i 91,3 mg alkohola (*R*)-**2a** ($\eta = 46\%$).

Snimljeni su NMR spektri koji odgovaraju spektrima racemata.

$$ev(\mathbf{2a}) = 84\%$$

$$ev(\mathbf{2b}) = 68\%$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{st}}(\mathbf{2a}) = +9,3 \text{ (c 1,08 CHCl}_3\text{)}$$

$$[\alpha]_{\text{D}}^{\text{st}}(\mathbf{2b}) = +91,2 \text{ (c 1,04 CHCl}_3\text{)}$$

$$E = 14$$

3.4.3.3. Biotransformacija alkohola **3a** katalizirana lipazom iz *Candida antartica*

U Erlenmeyerovu tikvicu od 250 mL dodan je alkohol **3a** (200 mg, 1,777 mmol), heksan (50 mL), vinil-acetat (10 mL, 140 mmol) i enzim CAL-B (100 mg). Reakcija je provedena u termostatiranoj tresilici na 30 °C i 220 rpm te prekinuta nakon 10 h kod konverzije od 30 %. Tijek reakcije je praćen GC-om. Reakcijska smjesa je profiltrirana i uparena te je dobiveno 40 mg smjese acetata **3b** i alkohola **3a**.

Snimljeni su NMR spektri koji odgovaraju spektrima racemata.

$$ev(\mathbf{3a}) = 30\%$$

$$ev(\mathbf{3b}) = 69\%$$

$$E = 7$$

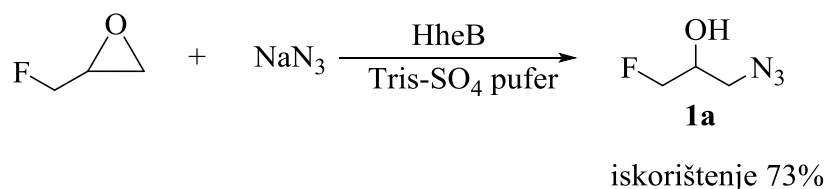
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Cilj istraživanja

Fluorirani organski spojevi su zanimljivi i često korišteni kao kiralni građevni blokovi. Mnoštvo lijekova se bazira na inhibiciji fluoriranim spojevima, kao što su antibiotici, antivirusi, antidepresivi, antidiabetici i drugi, stoga su istraživanja novih načina sinteze fluoriranih kiralnih građevnih blokova posebno bitna za farmaceutsku industriju.³¹ Ovaj rad se nastavlja na istraživanja u Laboratoriju za stereoselektivnu katalizu i biokatalizu u kojima je proučavana mogućnost dobivanja enantiomerno čistih fluoriranih alkohola pomoću različitih HDDH.² Budući da su HDDH pokazale nisku enantioselektivnost u reakcijama i potencijal za sintezu samo racemičnih produkata, istraživanja u tom području nastavljena su u smjeru ispitivanja drugih biokatalitičkih pristupa kojima bi se mogli pripremiti ovi komercijalno zanimljivi spojevi. Cilj ovog rada je ispitati enantioselektivnosti niza različitih lipaza u reakcijama transesterifikacije racemičnih fluoroalkohola **1a-3a** (shema 1).

4.2. Sintaza supstrata i racemičnih standardnih spojeva

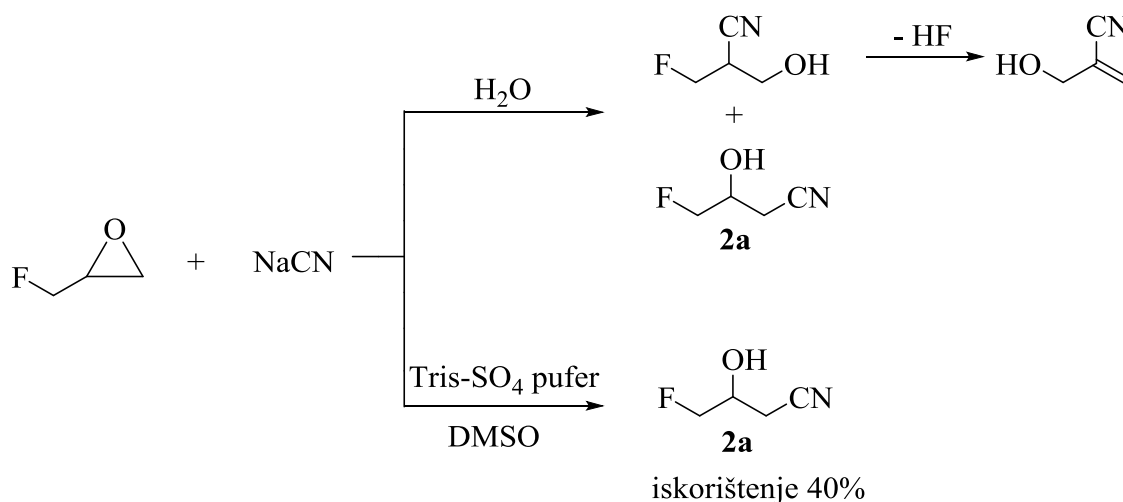
Kao supstrati za lipaze korišteni su racemični alkoholi **1a-3a**. Dok je spoj **3a** komercijalno dostupan, spojeve **1a** i **2a** bilo je potrebno pripremiti. Sintaza spoja **1a** provedena je polazeći iz racemičnog epifluorhidrina (Shema 4). Azidoliza epoksida provedena je koristeći halogenhidrin dehalogenazu HheB kao katalizator prema literaturnom propisu.² Reakcija je provedena uz 1,5 ekvivalenata natrijeva azida, a produkt **1a** je dobiven u iskorištenju od 73 %.



Shema 4.

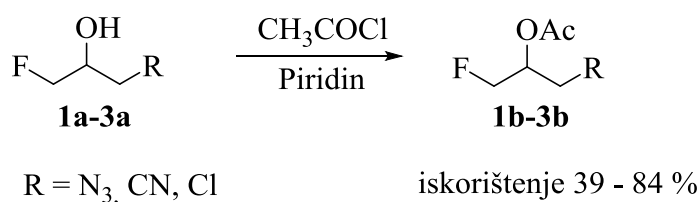
Epifluorhidrin reagira spontano s natrijevim azidom brzinom od otprilike 10 % / h.^{32,33} Dodatkom enzima reakcija se znatno ubrzava, pri čemu se vrijeme reakcije znatno skraćuje, a nastajanje nusprodukata, poput diola, smanjuje.

Reakcijom otvaranja epifluorhidrina natrijevim cijanidom kataliziranom enzimom HheB nastaje blago enantiomerno obogaćeni cijanoalkohol **2a**, $ev = 18$ %. Stoga je sinteza racemičnog **2a** provedena kemijskim putem. U reakciji s 5 ekvivalenata NaCN provedenoj u destiliranoj vodi nastaje smjesa regioizomera (shema 5). Eliminacijom HF iz primarnog alkohola nastaje 2-(hidroksimetil)akrilonitril kao nusprodukt. Reakcija dobivanja **2a** ponovljena je u smjesi Tris-SO₄ pufer / DMSO u kojoj je topljivost supstrata veća. Reakcija u ovim uvjetima je brža te je izbjegnuta sporedna reakcija. Na ovaj način alkohol **2a** pripravljen je kemijski čist i u iskorištenju od 40 %.



Shema 5.

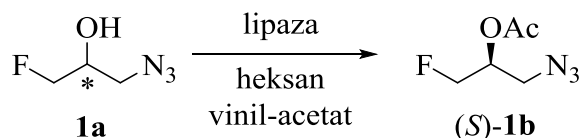
Za razradu analitičkih metoda i određivanje enantiomerne čistoće produkata enzimskih reakcija bilo je potrebno pripremiti racemične acetate **1b-3b** kao standardne spojeve. Acetiliranjem racemične smjese alkohola acetil-kloridom u piridinu prema standardnom postupku pripremljeni su *rac*-**1b** u iskorištenju od 39 %, *rac*-**2b** u iskorištenju od 84 % i *rac*-**3b** u iskorištenju od 52 % (Shema 6).



Shema 6.

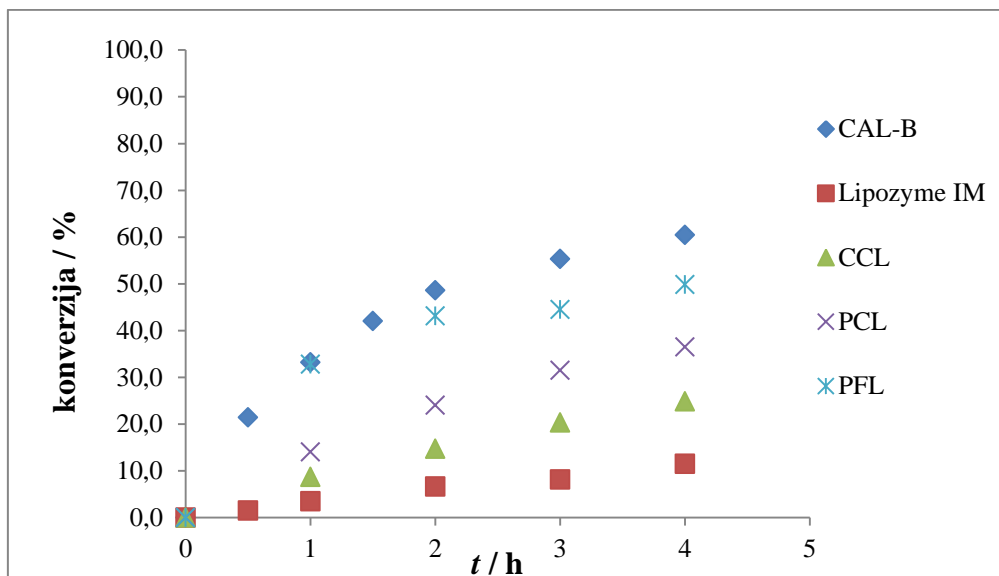
4.3. Kinetička rezolucija alohola **1a-3a**

U prvoj seriji eksperimenata ispitana je enantioselektivnost nekoliko komercijalnih lipaza u reakcijama transesterifikacije *rac*-**1a-3a** u heksanu kao otapalu i s vinil-acetatom kao acil-donorom. Korišteno je 5 lipaza: CAL-B, Lipozyme IM, CCL, PCL i PFL. Reakcije su provedene pri 30 °C uz maseni omjer enzim:supstrat = 1:1. Plinskom kromatografijom praćen je tijek reakcija te je na kiralnoj koloni određena enantiomerna čistoća neizreagiranog supstrata i produkta iz čega je izračunata enantioselektivnost reakcije (*E*-vrijednost). Rezultati acetiliranja *rac*-**1a** prikazani su u tablici 4 i na slici 8.

Tablica 4. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac*-**1a**

| lipaza | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (1b) ^a / % | <i>ev</i> (1a) ^a / % | <i>E</i> |
|-------------|--------------|-----------|--|--|----------|
| CAL-B | 1,5 | 42 | 55 (<i>S</i>) | 40 (<i>R</i>) | 5 |
| Lipozyme IM | 24 | 36 | 91 (<i>S</i>) | 51 (<i>R</i>) | 36 |
| CCL | 4 | 25 | 0 | 0 | / |
| PCL | 4 | 36 | 90 (<i>S</i>) | 52 (<i>R</i>) | 33 |
| PFL | 1 | 32 | 92 (<i>S</i>) | 44 (<i>R</i>) | 35 |

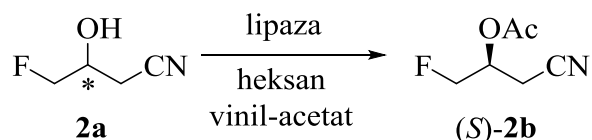
^a u zagradi je navedena apsolutna konfiguracija izoliranog produkta (**1b**) i neizreagiranog supstrata (**1a**)



Slika 8. Krivulje tijeka acetiliranja *rac*-**1a** u heksanu različitim lipazama

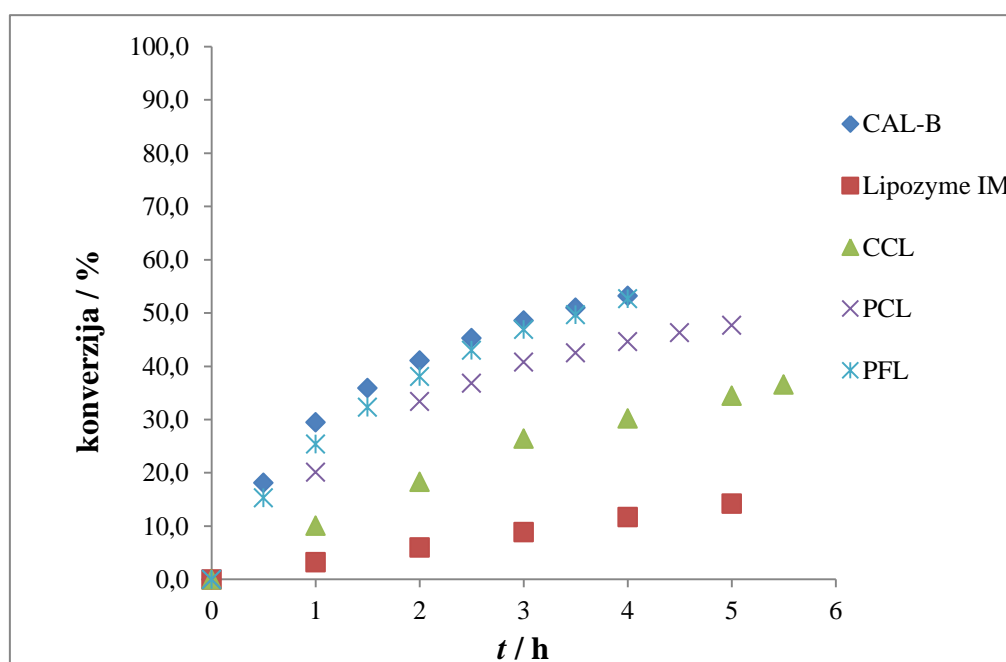
CAL-B se pokazao kao najaktivniji, dok Lipozyme IM kao najenantioselektivniji enzim. CAL-B ima veliko aktivno mjesto i lako smješta oba enantiomera relativno malenog supstrata **1a**, što za posljedicu ima nisku enantioselektivnost ($E = 7$). Lipozyme IM ima vrlo slabu aktivnost, no pokazuje dobru enantioselektivnost s ovim supstratom ($E = 36$), slično kao i lipaze iz PCL ($E = 33$) i PFL ($E = 35$), dok je CCL potpuno neselektivan prema ovom supstratu. Za daljnje istraživanje odabrana je PFL zbog veće aktivnosti od lipaze Lipozyme IM.

Acetiliranje *rac*-**2a** provedeno je pri istim reakcijskim uvjetima. Rezultati su prikazani su u tablici 5 i na slici 9.

Tablica 5. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac*-**2a**

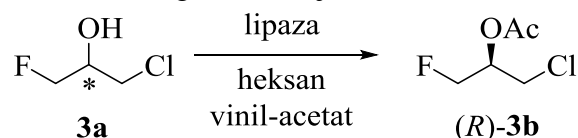
| lipaza | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (2b) ^a / % | <i>ev</i> (2a) ^a / % | <i>E</i> |
|-------------|--------------|-----------|--|--|----------|
| CAL-B | 2,5 | 51 | 60 (S) | 63 (R) | 7 |
| Lipozyme IM | 24 | 38 | 83 (S) | 51 (R) | 18 |
| CCL | 5 | 32 | 13 (S) | 6 (R) | 1 |
| PCL | 5 | 55 | 72 (S) | 88 (R) | 18 |
| PFL | 3 | 54 | 51 (S) | 61 (R) | 6 |

^a u zagradi je navedena apsolutna konfiguracija izoliranog produkta (**2b**) i neizreagiranog supstrata (**2a**)

Slika 9. Krivulje tijeka acetiliranja *rac*-**2a** u heksanu različitim lipazama

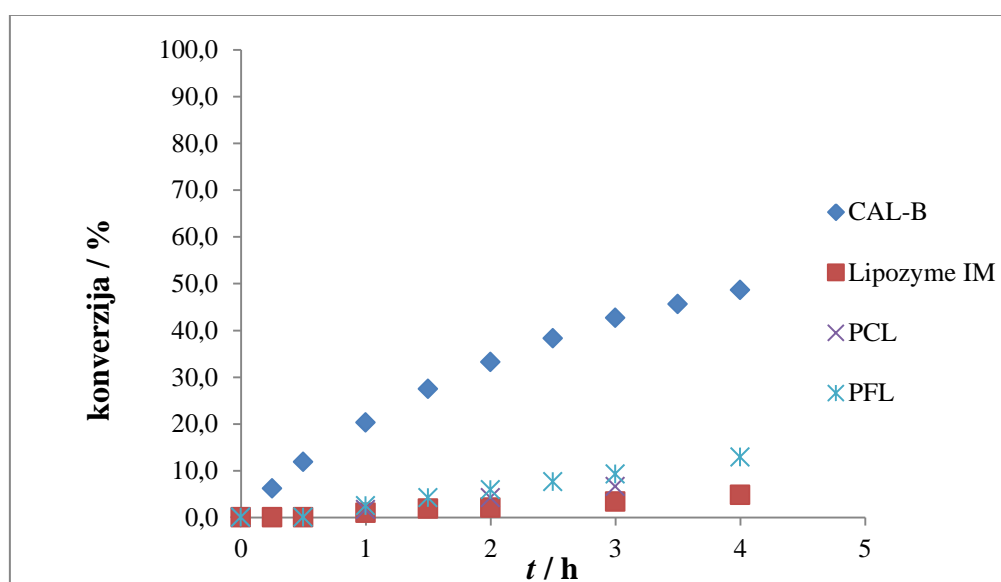
Kataliza esterifikacije alkohola **2a** odvija se uz nižu enantioselektivnost, najviša je postignuta s PCL i Lipozyme IM ($E=18$). Budući da je aktivnost Lipozima IM dosta niža, za daljnja istraživanja odabrana je PCL. CAL-B, CCL i PCL pokazuju vrlo nisku enantioselektivnost ($E = 1 - 7$).

Rezultati acetiliranja *rac*-**3a** prikazani su u tablici 6 i na slici 10.

Tablica 6. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac*-**3a**

| lipaza | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (3b) ^a / % | <i>ev</i> (3a) ^a / % | <i>E</i> |
|-------------|--------------|-----------|--|--|----------|
| CAL-B | 4 | 54 | 57 (<i>R</i>) | 67 (<i>S</i>) | 7 |
| Lipozyme IM | 24 | 19 | 39 (<i>R</i>) | 10 (<i>S</i>) | 2 |
| CCL | 24 | 7,3 | no | No | / |
| PCL | 24 | 41 | 37 (<i>R</i>) | 26 (<i>S</i>) | 3 |
| PFL | 24 | 54 | 22 (<i>R</i>) | 26 (<i>S</i>) | 2 |

^a u zagradi je navedena apsolutna konfiguracija izoliranog produkta (**3b**) i neizreagirano supstrata (**3a**)

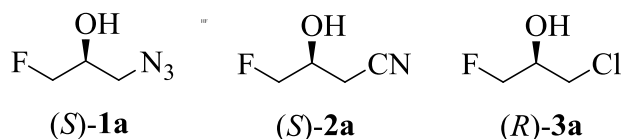
Slika 10. Krivulje tijeka acetiliranja *rac*-**3a** u heksanu različitim lipazama

U slučaju alkohola **3a** aktivnost i enantioselektivnost svih 5 enzima je niža u odnosu na **1a** i **2a** (slika 10, tablica 6, *E* = 1 – 7). Najveću *E*-vrijednost pokazuje CAL-B (*E* = 7).

Uočljivo je da je CAL-B najaktivniji od svih enzima (slike 8–10). Supstituent na kiralnom centru nema značajan utjecaj na aktivnost (40 – 50 % konverzije postignuto unutar 3 h), kao i na enantioselektivnost reakcije (*E* = 5 – 7). Aktivnost lipaze Lipozyme IM je usporediva za sva tri supstrata, dok enantioselektivnost ovisi o veličini „većeg supstituenta“ te

pada u smjeru N_3 ($E = 36$) > CN ($E = 18$) > Cl ($E = 2$). Isti trend uočen je i kod PCL i PFL. CCL je u reakcijama potpuno neselektivan.

Apsolutna konfiguracija produkata enzimskih reakcija određena je plinskom kromatografijom, usporedbom retencijskih vremena standardnih spojeva poznate apsolutne konfiguracije prethodno pripremljenih u laboratoriju. Relativna konfiguracija produkata svih enzimskih reakcija u skladu je s Kazlauskasovim pravilom, u slučaju **1a** i **2a** reaktivniji je *S*-enantiomer, dok je kod **3a** reaktivniji *R*-enantiomer (slika 11). Važno je uočiti da se radi o istoj relativnoj konfiguraciji, dok se apsolutna razlikuje zbog različitog prioriteta supstituenata na kiralnom centru (CIP pravilo).



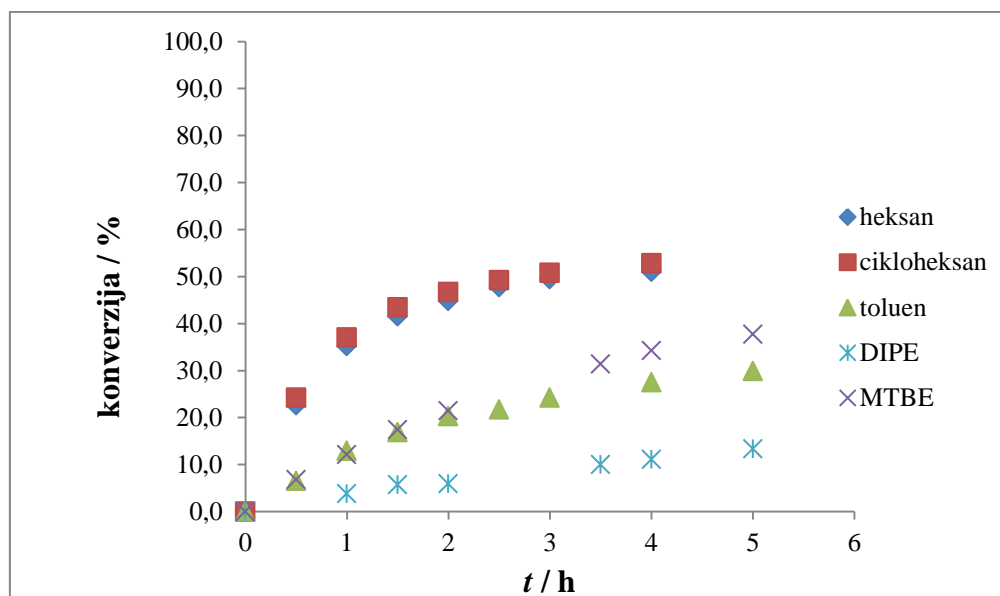
Slika 11. Reaktivniji enantiomeri supstrata i njihova apsolutna konfiguracija.

U sljedećem nizu eksperimenata ispitane su odabrane lipaze u različitim organskim otapalima: cikloheksanu, heksanu, metil-*t*-butil-eteru (MTBE), toluenu te diizopropil-eteru (DIPE). Rezultati acetiliranja *rac*-**1a** lipazom PFL prikazani su u tablici 7 i na slici 12.

Tablica 7. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac*-**1a** u različitim organskim otapalima.

| otapalo | log <i>P</i> | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (1b) / % | <i>ev</i> (1a) / % | <i>E</i> | aps. konf. ^a |
|-------------|--------------------|--------------|-----------|-----------------------------|-----------------------------|----------|-------------------------|
| heksan | 3,94 ³⁴ | 3 | 53 | 83 | 95 | 38 | <i>S</i> |
| cikloheksan | 3,34 ³⁵ | 2 | 49 | 86 | 84 | 33 | <i>S</i> |
| toluen | 2,73 ³⁵ | 3 | 30 | 92 | 39 | 34 | <i>S</i> |
| DIPE | 1,68 ³⁶ | 5 | 11 | 91 | 11 | 24 | <i>S</i> |
| MTBE | 1,15 ³⁷ | 5 | 37 | 89 | 53 | 29 | <i>S</i> |

^a apsolutna konfiguracija reaktivnijeg enantiomera supstrata

Slika 12. Krivulje tijeka acetiliranja *rac*-**1a** u različitim otapalima lipazom PFL

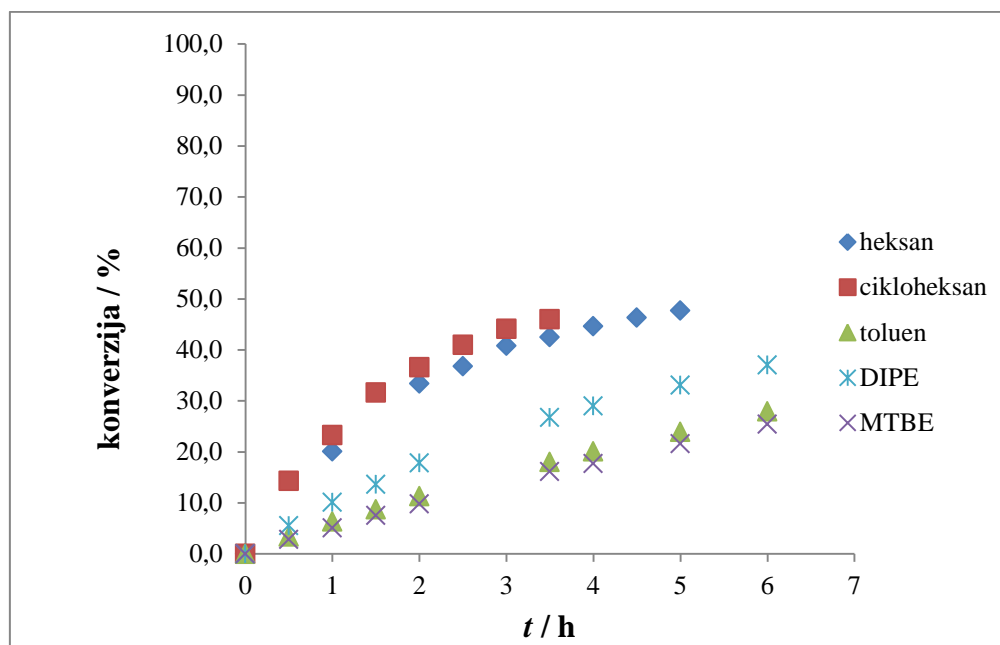
Uočeno je da polarnost otapala nema značajan utjecaj na enantioselektivnost reakcija, iako su *E*-vrijednosti nešto niže u eterskim otapalima. Puno veći utjecaj je na enzimsku aktivnost. U nepolarnim otapalima, kao što su heksan i cikloheksan, PFL je najaktivnija.

Rezultati acetiliranja *rac*-**2a** lipazom PCL u različitim otapalima prikazani su u tablici 7 i na slici 13.

Tablica 7. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac*-**2a** u različitim organskim otapalima

| otapalo | log <i>P</i> | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (2b) / % | <i>ev</i> (2a) / % | <i>E</i> | aps. konf. ^a |
|-------------|--------------------|--------------|-----------|--------------------|--------------------|----------|-------------------------|
| heksan | 3,94 ³⁴ | 5 | 55 | 72 | 88 | 18 | <i>S</i> |
| cikloheksan | 3,34 ³⁵ | 3 | 49 | 73 | 71 | 13 | <i>S</i> |
| toluen | 2,73 ³⁵ | 6 | 30 | 82 | 35 | 14 | <i>S</i> |
| DIPE | 1,68 ³⁶ | 6 | 41 | 79 | 55 | 15 | <i>S</i> |
| MTBE | 1,15 ³⁷ | 6 | 26 | 84 | 30 | 15 | <i>S</i> |

^a apsolutna konfiguracija reaktivnijeg enantiomera supstrata

Slika 13. Krivulje tijeka acetiliranja *rac-2a* u različitim otapalima lipazom PCL

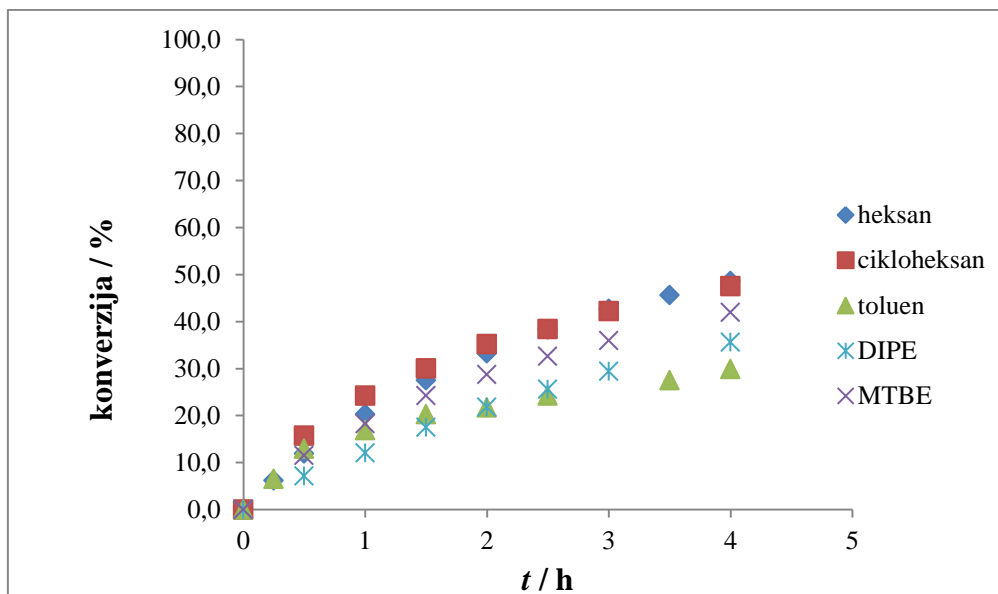
Sličan trend uočen je i kod PCL. *E*-vrijednosti su približno jednake i ispod 20 u svim otapalima, što znači da je PCL slabo selektivna i ne dolazi do značajne promjene ovisno o otapalu.

Rezultati acetiliranja *rac-3a* lipazom CAL-B u različitim otapalima prikazani su u tablici 8 i na slici 14.

Tablica 8. Rezultati enantioselektivnog acetiliranja *rac-3a* u različitim organskim otapalima

| otapalo | log <i>P</i> | <i>t</i> / h | konv. / % | <i>ev</i> (3b) / % | <i>ev</i> (3a) / % | <i>E</i> | aps. konf. ^a |
|-------------|--------------------|--------------|-----------|--------------------|--------------------|----------|-------------------------|
| heksan | 3,94 ³⁴ | 4 | 54 | 57 | 67 | 7 | <i>R</i> |
| cikloheksan | 3,34 ³⁵ | 4 | 45 | 58 | 48 | 6 | <i>R</i> |
| Toluene | 2,73 ³⁵ | 4 | 43 | 60 | 45 | 6 | <i>R</i> |
| DIPE | 1,68 ³⁶ | 4 | 34 | 58 | 30 | 5 | <i>R</i> |
| MTBE | 1,15 ³⁷ | 4 | 21 | 67 | 18 | 6 | <i>R</i> |

^a apsolutna konfiguracija reaktivnijeg enantiomera supstrata.



Slika 14. Krivulje tijeka acetiliranja *rac*-**3a** u različitim otapalima lipazom CAL-B

Kinetička rezolucija alkohola **3a** daje vrlo niske *E*-vrijednosti te je reakcija najbrže dosegla stupanj konverzije od 50 % u heksanu. Aktivnost CAL-B je vrlo bliska u najnepolarnijim otapalima (heksan, cikloheksan i toluen). Konverzija pravilno opada s porastom polarosti otapala.

Sva otapala su nepolarna i ne miješaju se s vodom, no eteri su blago polarniji: MTBE > DIPE > toluen > heksan > cikloheksan. Lipazama odgovara nepolarno otapalo u kojima se otvara poklopac nad aktivnim mjestom. Supstrati su polarniji pa se slabo otapaju u ovim otapalima. Reakcije su najefikasnije i najviše *E*-vrijednosti su postignute u najnepolarnijim otapalima, heksanu i cikloheksanu. Preparativne reakcije provedene su u heksanu kao otapalu u slučaju sva tri supstrata.

Biotransformacije **1a-3a** provedene su u heksanu s 200 – 570 mg supstrata (tablica 9). Kod priprave **1b**, reakcija je prekinuta nakon 3 h pri konverziji od 50 %. Izoliran je acetat (*S*)-**1b** u iskorištenju od 27 % i *ev* = 86 % te neizreagirani alkohol (*R*)-**1a** (*η* = 6 %, *ev* = 85 %). Ista reakcija ponovljena je s drugom šaržom enzima PFL koji je pokazao manju aktivnost i nešto višu enantioselektivnost. Korištena je pet puta manja masa enzima u odnosu na supstrat. Reakcija je zaustavljena nakon 7 h pri konverziji od 39 % te je izoliran (*S*)-**1b** (*η* = 53 %, *ev* = 92 %) i (*R*)-**1a** (*η* = 11 %, *ev* = 92 %).

Reakcija s **2a** zaustavljena je nakon 6 h pri konverziji od 55 %. Izoliran je (*S*)-**2b** (*η* = 53 %, *ev* = 68 %) i (*R*)-**2a** (*η* = 46 %, *ev* = 84 %). Reakcija s **3b** zaustavljena je nakon 10 h pri

konverziji od 30 % te je dobiveno 40 mg smjese acetata **3b** i alkohola **3a**. Spojevi **3a** i **3b** nisu dalje izolirani iz smjese zbog gubitka materijala zbog njihove hlapivosti.

Tablica 9. Rezultati preparativnih reakcija

| Supstrat | enzim | maseni omjer S : E | t / h | konv. / % | izolirani produkt | | | neizreagirani supstrat | | |
|---------------|-------|--------------------------|-------|-----------|-------------------|------------|--------|------------------------|------------|--------|
| | | | | | spoj | η / % | ev / % | spoj | η / % | ev / % |
| rac-1a | PFL | 2 : 1 | 3 | 50 | (S)- 1b | 27 | 86 | (R)- 1a | 6 | 85 |
| rac-1a | PFL | 5,3 : 1 | 7 | 39 | (S)- 1b | 11 | 92 | (R)- 1a | 11 | 60 |
| rac-2a | PCL | 2 : 1 | 6 | 55 | (S)- 2b | 53 | 68 | (R)- 2a | 46 | 84 |
| rac-3a | CAL-B | 2 : 1 | 10 | 30 | (R)- 3b | n.o. | 69 | (S)- 3a | n.o. | 30 |

§ 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je enantioselektivnost niza lipaza u reakcijama transesterifikacije racemičnih fluoroalkohola **1a-3a** u organskim otapalima.

Rac-1a pripremljen je koristeći enzimsku metodu, a *rac-2a* i racemični acetati **1b-3b** pripremljeni su standardnim kemijskim metodama.

U kinetičkoj rezoluciji alkohola **1a-3a** ispitano je 5 različitih lipaza u heksanu kao otapalu. Utvrđeno je da je aktivnost i enantioselektivnost ovisna o supstratu i o razlici veličine „malog“ i „velikog“ supstituenta na kiralnom centru. Izbor organskog otapala nema značajan utjecaj na enantioselektivnost reakcije, dok ima velik utjecaj na enzimsku aktivnost. Reakcije su brže u nepolarnim otapalima, a kako polarnost raste, brzina reakcije pada. U svim enzimskim reakcijama nastaju produkti iste relativne konfiguracije, dok se apsolutna konfiguracija razlikuje zbog različitog prioriteta supstituenata na kiralnom centru. Reaktivniji su enantiomeri (*S*)-**1a**, (*S*)-**2a** i (*R*)-**3a**.

Preparativne reakcije provedene su na skali od 200 mg u heksanu kao otapalu s enzimima koji su pokazali najveću enantioselektivnost. U slučaju **1a** korištena je PFL (*E* = 36), **2a** PCL (*E* = 14) i CAL-B za **3a** (*E* = 7). Produkti enzimskih reakcija, acetati, izolirani su u iskorištenju 11 – 53 %, enantiomerne čistoće 68 – 92 %. Neizreagirani supstrati izolirani su u iskorištenjima 6 – 84 % i enantiomerne čistoće 60 – 85 %.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

ATP – adonizin trifosfat

CAL-A – lipaza iz *Candida antarctica* izoenzim A

CAL-B – lipaza iz *Candida antarctica* izoenzim B

CCL – lipaza iz *Candida cylindracea*

CMC – kritična micelarna koncentracija

DCM – diklormetan

DIPE – diizopropil-eter

DMSO – dimetilsulfoksid

E – enantiomerni omjer

E – enzim

ev(P) – enantiomerni višak produkta, %

ev(S) – enantiomerni višak supstrata, %

ES – kompleks enzim-supstrat

EtOAc – etil-acetat

GC – plinska kromatografija

HHDH – halogenhidrin dehalogenaza

HheB – halogenhidrin dehalogenaza iz *Mycobacterium* sp.

IUBMB – Međunarodna zajednica za biokemiju i molekularne biologiju, engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*

Lipozyme IM – imobilizirana lipaza iz *Mucor miehei*

MSL – lipaza iz *Mucor* sp.

MTBE – *t*-butil-metil-eter

NAD(P)H – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NMR – nuklearna magnetska rezonancija, engl. nuclear magnetic resonance

P – produkt

PPL – lipaza iz svinjske gušterače

PSL – lipaza iz *Pseudomonas* sp.

*R*_t – retencijsko vrijeme

S – supstrat

TMS – tetrametilsilan

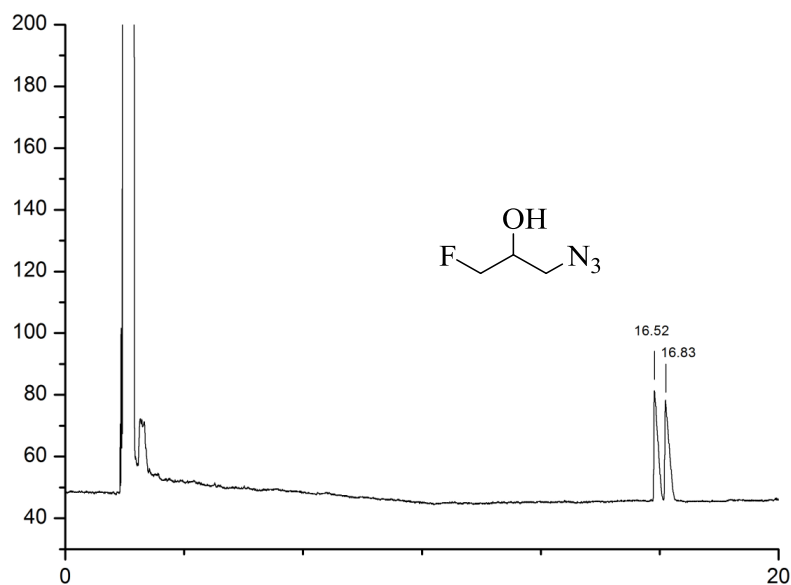
§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. V. P. Reddy, *Organofluorine Compunds in Biology and Medicine*, Elsevier, Amsterdam, 2015, str. 1–4, 13.
2. M. Majerić Elenkov, M. Čičak, A. Smolko, A. Knežević, *Tetrahedron Lett.* **59** (2018) 406–408.
3. M. I. Page, *Angew. Chem.* **16** (1977) 449–459.
4. International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, New York, 1992.
5. R. Wolfenden, M. J. Snider, *Acc. Chem. Res.* **34** (2001) 938–945.
6. A. Kumar, K. Dhar, S. S. Kanwar, P. Kumar Arora, *Biol. Proced. Online* **18** (2016)
7. K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Heidelberg, 2011, str. 1–16., 38–40., 87–104., 265–266.
8. L. Michaelis, M. Menten, *Biochem Z* **49** (1913) 333–369.
9. G. E. Briggs, J. B. S. Haldane, *Biochem J.* **19** (1925) 338–339.
10. L. Sarda, P. Desnuelle, *Biochim. Biophys. Acta* **30** (1958) 513–521.
11. J. Kraut, *Science* **242** (1988) 533–540.
12. J. D. Fischer, G. L. Holliday, S. A. Rahman, J. M. Thornton, *J Mol Biol.* **403** (2010) 803–824.
13. T. Oberhauser, M. Bodenteich, K. Faber, G. Penn, H. Griengl, *Tetrahedron* **43** (1987) 3931–3944.
14. C. Chen, Y. Fujimoto, G. Girdaukas, C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.* **104** (1982) 7294–7299.
15. R. Verger, *Trends Biotechnol.* **15** (1997) 32–38.
16. L. Brady, A. M. Brzozowski, Z. S. Derewenda, E. Dodson, G. Dodson, S. Tolley, J. P. Turkenburg, L. Christiansen, B. Huge-Jensen, L. Norskov, L. Thim, U. Menge, *Nature* **343** (1990) 767–770.
17. P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schrag, M. Cygler, *Protein Sci.* **3** (1994) 82–91.
18. K. Kyeong, K. Hyun, H. Dong, Y. Kwang, W. Se, *Curr. Biol. Structure* **5** (1997) 173–185.
19. B. Stauch, S. J. Fisher, M. Cianci, *J. Lipid Res.* **56** (2015) 2348–2358.
20. D. Bianchi, P. Cesti, *J. Org. Chem.* **55** (1990) 5657–5659.

21. R. J. Kazlauskas, A. N. E. Weissfloch, A. T. Rappaport, L. A. Cuccia, *J. Org. Chem.* **56** (1991) 2656–2665.
22. P. Grochulski, Y. Li, J. D. Schragt, F. Bouthillier, P. Smith, D. Harrison, B. Rubin, M. Cygler, *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 12843–12847.
23. G. G. Dodson, D. M. Lawson, F. K. Winkler, *Faraday Discuss.* **93** (1992) 95–105.
24. <https://slideplayer.com/slide/4741112/> (datum pristupa 3. veljače 2019.)
25. N. Tanaka, T. Nonaka, T. Tanabe, T. Yoshimoto, D. Tsuru, and Y. Mitsui, *Biochemistry* **35** (1996) 7715–7730.
26. J. E. T. van Hylckama Vlieg, L. Tang, J. H. Lutje Spelberg, T. Smilda, G. J. Poelarends, T. Bosma, A. E. J. van Merode, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *J. Bacteriol.* **183** (2001) 5058–5066.
27. L. Tang, J. H. Lutje Spelberg, M. W. Fraaije, D. B. Janssen, *Biochemistry* **42** (2003) 5378–5386.
28. G. Hasnaoui-Dijoux, M. Majerić Elenkov, J. H. Lutje Spelberg, B. Hauer, D. B. Janssen, *Chembiochem* **9** (2008) 1048–1051.
29. M. Majerić Elenkov, W. Szymanski, D. B. Janssen, u K. Faber, W.-D. Fessner, N. Turner (ur.), *Science of Synthesis; Biocatalysis in Organic Synthesis 2*, Vol. 1, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2014, str. 507–527.
30. M. Majerić Elenkov, B. Hauer, D. B. Janssen, *Adv. Synth. Catal.* **348** (2006) 579–585.
31. T. Palmer, P. Bonner, *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology and Clinical Chemistry*, Woodhead Publishing, Cambridge, 2007, str. 133–171.
32. M. Chini, P. Crotti, L. Favero, F. Macchia, *Tetrahedron Lett.* **32** (1991) 4775–4778.
33. J. A. Ciaccio, M. Smrtka, W. A. Maio, D. Rucando, *Tetrahedron Lett.* **45** (2004) 7201–7204.
34. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7767.html?rid=6884b601-2fbf-4325-8bf4-7f502fb1c0ae> (datum pristupa 11. siječnja 2019.)
35. E. L. Willighagen, H. M. G. W. Denissen, R. Wehrens, L. M. C. Buydens, *J. Chem. Inf. Model.* **46** (2006) 487–494
36. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7626.html?rid=7e2bd1a4-66fb-4e8c-9e1e-44c203ea438c> (datum pristupa 11. siječnja 2019.)
37. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14672.html?rid=9f524a86-de38-4c1e-bc5d-5e791290fa45> (datum pristupa 11. siječnja 2019.)

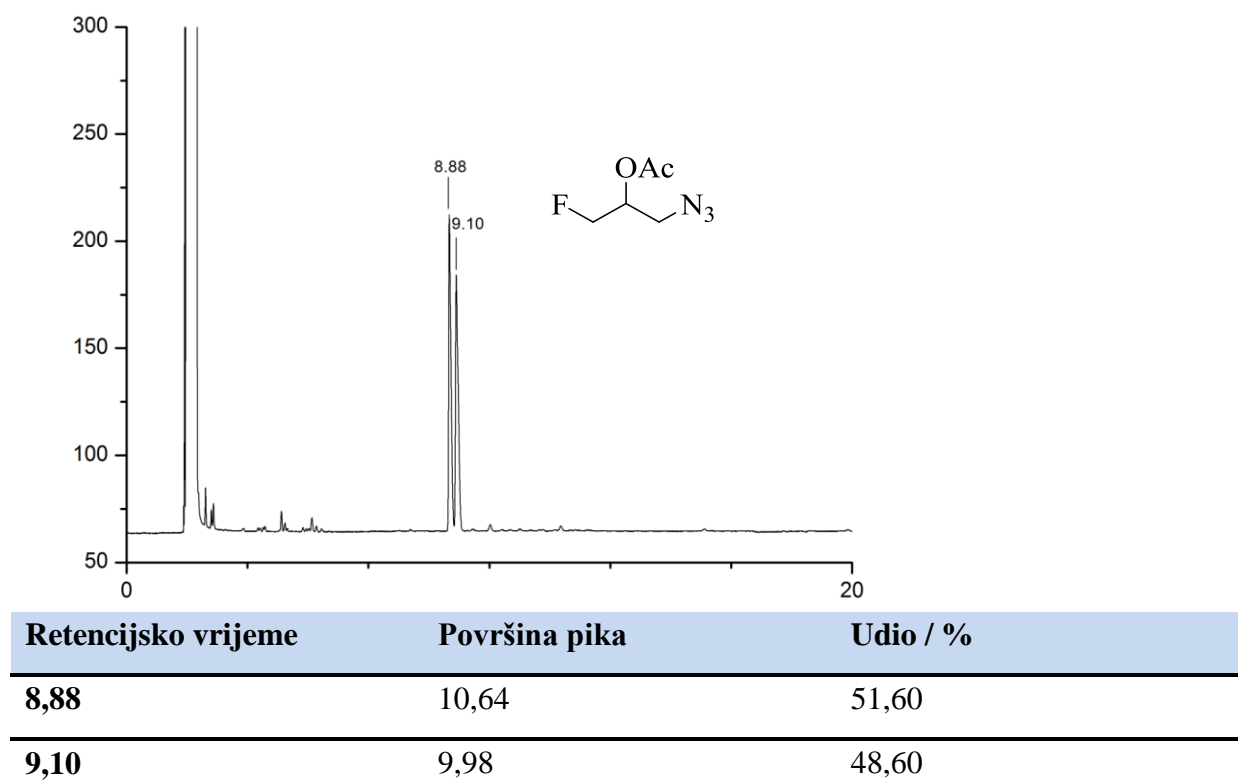
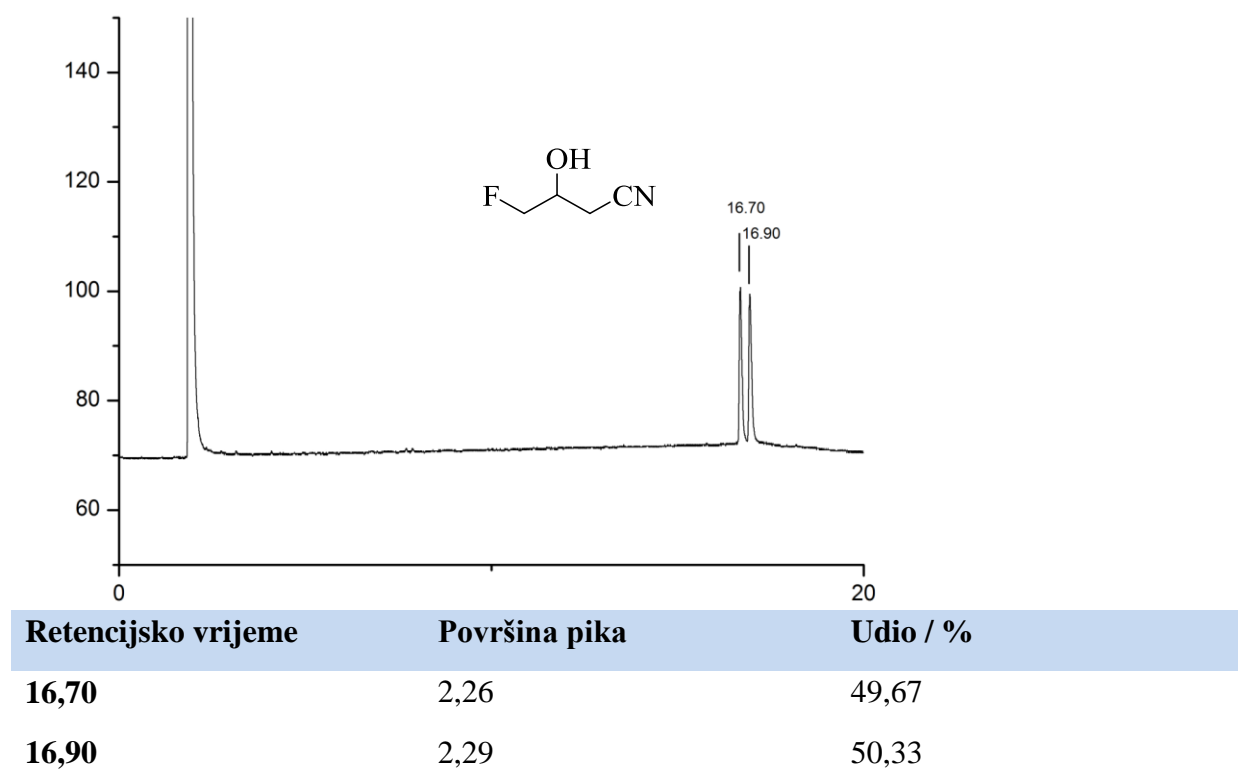
§ 8. DODATAK

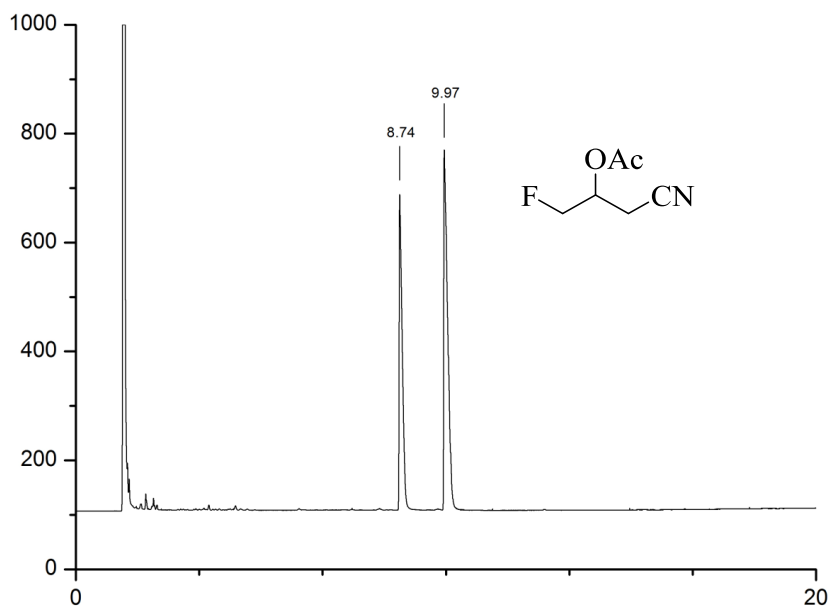
8.1. GC kromatogrami



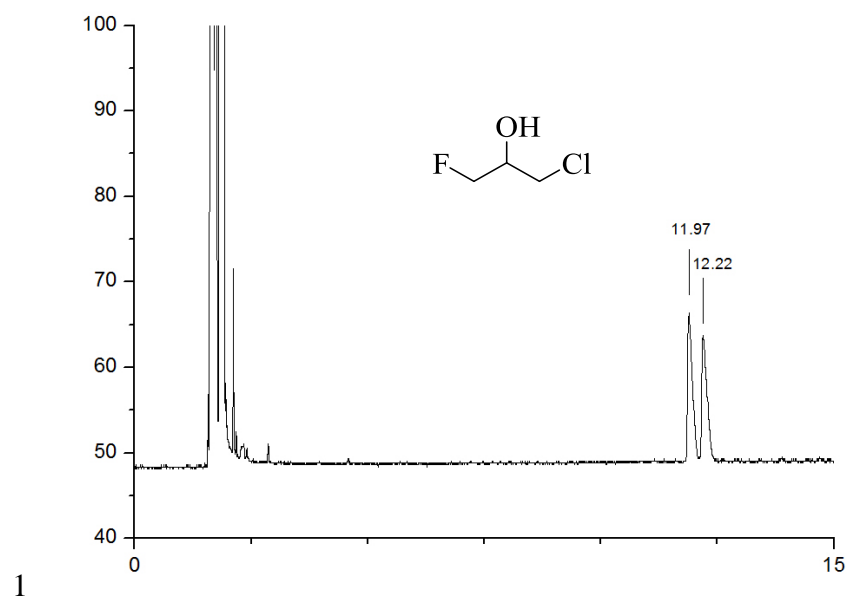
| Retencijsko vrijeme | Površina pika | Udio / % |
|---------------------|---------------|----------|
| 16,52 | 4,30 | 50,47 |
| 16,83 | 4,22 | 49,53 |

Slika 15. Kromatogram racemičnog alkohola **1a**

Slika 16. Kromatogram racemičnog acetata **1b**Slika 17. Kromatogram racemičnog alkohola **2a**

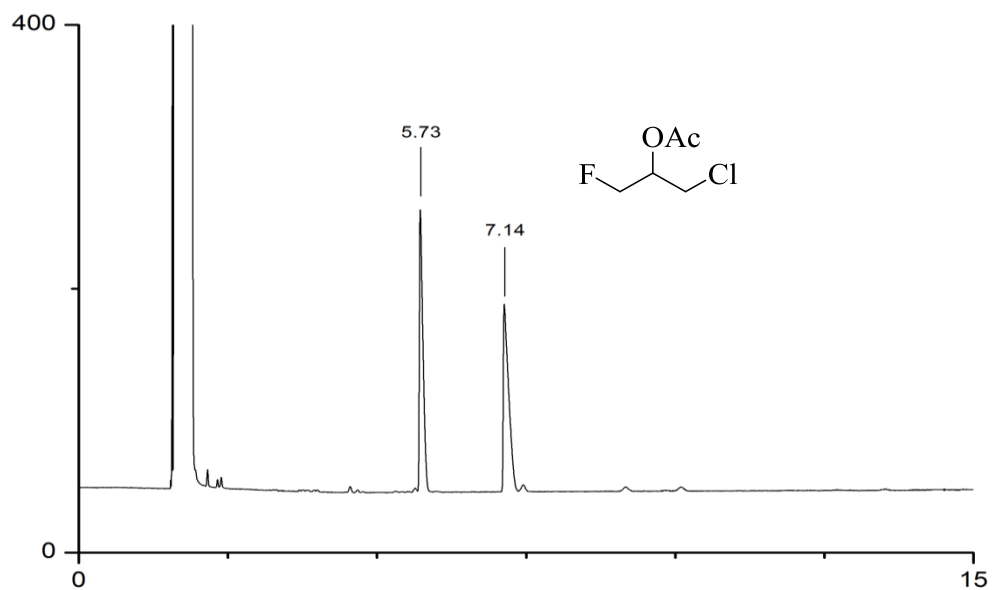


| Retencijsko vrijeme | Površina pika | Udio / % |
|---------------------|---------------|----------|
| 8,74 | 55,45 | 41,00 |
| 9,97 | 79,77 | 59,00 |

Slika 18. Kromatogram racemičnog acetata **2b**

| Retencijsko vrijeme | Površina pika | Udio / % |
|---------------------|---------------|----------|
| 11,97 | 1,98 | 50,16 |
| 12,22 | 1,97 | 49,84 |

Slika 19. Kromatogram racemičnog alkohola **3a**



| Retencijsko vrijeme | Površina pika | Udio / % |
|---------------------|---------------|----------|
| 5,73 | 14,86 | 50,34 |
| 7,14 | 14,66 | 49,66 |

Slika 20. Kromatogram racemičnog acetata **3b**

§ 9. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: Valentina Ević

Datum rođenja: 10. studenog 1994.

Mjesto rođenja: Zagreb

Obrazovanje

2001–2009 Osnovna škola Obrovac, Obrovac

2009–2013 Srednja škola Obrovac, Obrovac

2013–2016 Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; Preddiplomski studij kemije (završni rad: „Feritin – do 4500 iona željeza po molekuli proteina“, mentor: prof. dr. sc. D. Matković-Čalogović)

2016–2019 Kemijski odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; Diplomski studij kemije, grane: Biokemija i Organska kemija

Sudjelovanja i aktivnosti

2014 Smotra Sveučilišta u Zagrebu

2015 Otvoreni dan kemije

2016 Otvoreni dan kemije

2017 Otvoreni dan kemije

2018 Otvoreni dan kemije